ANA CAROLINA BIONE KUNICKI

**Dinâmica do sistema córtico-hipocampal durante o condicionamento
contextual de medo**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Programa de: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Koichi Sameshima**

**São Paulo
2011**

ANA CAROLINA BIONE KUNICKI

**Dinâmica do sistema córtico-hipocampal durante o condicionamento
contextual de medo**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Programa de: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Koichi Sameshima**

**São Paulo
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Kunicki, Ana Carolina Bione

Dinâmica do sistema cortico-hipocampal durante o condicionamento contextual de medo / Ana Carolina Bione Kunicki. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Koichi Sameshima.

Descritores: 1.Memória de longo prazo/fisiologia 2.Memória de curto prazo/fisiologia 3.Ritmo teta 4.Eletrofisiologia 5.Ondas encefálicas/fisiologia 6.Hipocampo 7.Córtex pré-frontal 8.Condicionamento clássico 9.Aprendizagem 10.Ratos

USP/FM/DBD-363/11

*A minha avó, Eunice, a minha mãe, Marta e
as minhas tias, Arminda e Neusa.*

*“De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar...
Façamos da interrupção um novo
caminho...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro”*

Fernando Sabino

Agradecimentos

Aos meus pais, Marta Cristina Bione Kunicki e Silvério Travassos Sarinho, e a minha avó, Maria Eunice de Almeida e Silva, pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, Joan Carlo Bione Kunicki, pelo amor e carinho.

Aos meus familiares, Arminda, Neusa, Josefa, Lilia, Jane, Roberto e Solange pelo carinho e apoio.

Aos professores Romildo de Albuquerque Nogueira e Ângela Nankran Rosa, pela amizade e orientação desde a iniciação científica.

Aos professores, Koichi Sameshima e Sidarta Ribeiro, pela orientação e suporte para o desenvolvimento deste projeto.

Ao coordenador do laboratório, Edgard Morya, pela dedicação, disponibilidade e ajuda imprescindíveis para o desenvolvimento do projeto.

Aos pesquisadores, Birajara Soares Machado e Hilda Cerdeira, sem os quais este trabalho não seria possível, pela dedicação e paciência.

Ao Pesquisador Miguel Nicolelis, por trazer ao Brasil os recursos e as técnicas que empreguei neste trabalho.

Aos pesquisadores Gary Lehew e Marco Freire, pela atenção e disposição para ensinar algumas das técnicas empregadas neste trabalho.

Ao Professor Edson Amaro Jr., pelas sugestões na redação do artigo científico.

Ao Professor Ronald Ranvaud, pelas discussões sempre enriquecedoras.

Ao Professor Claudio Cohen, pelas ricas discussões no estágio docência.

Aos colegas do laboratório de neurociências, André Cravo, pelas discussões e ajuda na análise dos dados, André Coleman, Cyrus Villas Boas, pelo apoio e colaboração.

Aos colegas do laboratório de Biofísica Teórica e Computacional da UFRPE, Jeine Silva, Lázaro de Souto Araújo e Bruno Tenório, pelo incentivo e amizade.

Aos colegas da Fundação Champalimaud, Thiago Gouvêa, Andre Luzardo, Gustavo Moreno e Claire Monroy, pelo carinho ao me receberem em Lisboa.

Aos meus amigos, André Duarte, Vilna, Dolores, Hadassa Batinga, Adriana Leão, Rodrigo Acioli, Isabelle Valente, Francisco Gozalo, Tânia Consuelo, Carlos Weber, Arnaldo Cheixas, Kleber Oliveira, Carolina Lopez, Paloma Pascoal, Erika Dantas, Maria Helena e Jorge Lopez, pelo incentivo e apoio em momentos cruciais da minha vida.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela estrutura e oportunidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental, em especial, a Tania Regina de Souza, pela atenção e gentileza.

À Associação Alberto Santos Dumont para Apoio à Pesquisa (AASDAP) e ao Instituto Internacional de Neurociências de Natal Edmond e Lily Safra (IINN-ELS), pelo suporte para o desenvolvimento deste projeto.

Aos funcionários da AASDAP, em especial a Adriana Ragoni, pelo carinho e suporte durante a minha estadia em Natal.

Ao Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês, pela estrutura e suporte financeiro.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Duke University e a FINEPE, pelo suporte financeiro.

Muito obrigada a todos.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE SIGLAS

AB	basal acessório
AP	ântero-posterior
ACC	córtex cingulado anterior. Do inglês, <i>anterior cingulate cortex</i>
B	núcleo basal da amígdala
CA1	sub região hipocampal, Corno de Amon 1
CA3	sub região hipocampal, Corno de Amon 3
CAPPesq	Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa
CCM	condicionamento contextual de medo
CE	núcleo central da amígdala
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFO	região orbital do córtex pré-frontal medial
CO ₂	dióxido de carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CeL	regiões lateral do núcleo central da amígdala
CeM	regiões medial do núcleo central da amígdala
DV	dorso-ventral
e.c.	cápsula externa da amígdala
EEG	eletroencefalograma
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IL	córtex infra-límbico
LA	Núcleo lateral da amígdala
LO	região lateral do córtex frontal orbital
LFP	potencial de campo local. Do inglês, <i>local field potential</i>
LTD	depressão de longa duração. Do inglês, <i>long-term depression</i>
LTP	potencialização de longa duração. Do inglês, <i>long-term potentiation</i>
ML	médio-lateral
MO	córtex orbital medial
PCB	placa de circuito impresso. Do inglês, <i>printed-circuit boards</i>
PFCm	córtex pré-frontal medial. Do inglês, <i>prefrontal cortex</i>
PrL	córtex pré-límbico. Do inglês, <i>prelimbic cortex</i>
V1	córtex visual primário
VO	região ventral do córtex frontal orbital

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
kg	kilogra
kHz	kilohertz
mA	miliampere
mg	miligrama
MΩ	megaohm
μm	micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conexões do sistema límbico.....	5
Figura 2 - Circuitaria do medo.....	22
Figura 3 - Região amigdalóide.....	23
Figura 4 - Representação esquemática PFC.....	29
Figura 5 - Etapas de construção dos microeletrodos.....	44
Figura 6 - Arranjo das matrizes de microeletrodos.....	45
Figura 7 - Etapas da cirurgia de implante.....	47
Figura 8 - Sítios de implante das matrizes.....	48
Figura 9 - Registro multi-unitário.....	49
Figura 10 - Registro unitário.....	50
Figura 11 - Sala de registro eletrofisiológico.....	52
Figura 12 - Fluxograma do experimento.....	54
Figura 13 - seleção dos trechos LFP.....	57
Figura 14 - Razão entre espectros.....	68
Figura 15 - Decomposição LFP.....	60
Figura 16 - Método de causalidade.....	63
Figura 17 - Taxa de congelamento e $\delta\theta$ -razão.....	68
Figura 18 - Espectro de potência e escalograma.....	70
Figura 19 - Sincronização de fase.....	75
Figura 20 - Perfusão.....	76
Figura 21 - Histologia.....	76

SUMÁRIO

Lista de siglas	
Lista de símbolos	
Lista de figuras	
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ritmos cerebrais.....	2
1.1.1 Ritmo teta.....	2
1.1.2 Ritmo gama.....	7
1.1.3 Ritmo delta.....	9
1.2 Aprendizado e memória.....	10
1.2.1 Tipos de memória.....	14
1.3 Medo.....	15
1.4 Medo condicionado.....	20
1.5 Circuitaria neural envolvida no medo condicionado.....	21
1.5.1 Córtex pré-frontal medial.....	27
1.5.2 Córtex pré-límbico.....	30
1.5.3 Córtex cingulado anterior.....	31
1.5.4 Hipocampo.....	34
1.5.5 Conexões entre o hipocampo e o PFCm.....	37
2. OBJETIVOS.....	40
2.1 Objetivos gerais.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Animais.....	43
3.2 Matriz de Microeletrodos.....	43
3.3 Procedimento cirúrgico.....	46
3.4 Registro eletrofisiológico.....	48
3.5 Aparato do experimento comportamental.....	51
3.6 Treinamento comportamental.....	52
3.7 Perfusão e histologia.....	55
3.8 Análise de dados.....	55
3.8.1 Análise comportamental.....	55
3.8.2 Análise eletrofisiológica.....	56
3.8.2.1 Razão entre espectros de potência (θ -razão).....	58

3.8.2.2 Causalidade.....	61
3.8.2.3 Sincronização de fase.....	64
3.8.3 Análise estatística.....	65
4. RESULTADOS.....	66
4.1 Análise comportamental.....	67
4.2 Análise eletrofisiológica.....	69
4.3 Análise histológica.....	76
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÕES.....	83
7. ANEXOS.....	85
7.1 Transformada de Fourier.....	86
7.2 Periodograma de Batlett.....	88
7.3 Periodograma de Welch.....	89
7.4 Previsibilidade cruzada não linear (causalidade).....	90
7.5 Transformada em ondeletas (wavelet).....	93
7.6 Sincronia de fase.....	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
9. Apêndice	

Kunicki ACB. Dinâmica do sistema córtico-hipocampal durante o condicionamento contextual de medo [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Resumo

O estabelecimento das memórias de longo prazo requer uma efetiva comunicação do hipocampo com o neocortex. Um mecanismo plausível envolvido na comunicação neuronal e na plasticidade sináptica é a sincronização da atividade elétrica cerebral na frequência teta. Estudos recentes mostraram que a sincronização entre os ritmos teta do hipocampo e do córtex pré-frontal aumenta durante a evocação das memórias aversivas e diminui após a extinção do aprendizado. Entretanto, outros ritmos cerebrais, como as ondas delta, também estão envolvidos nas respostas comportamentais do medo e nos processos de memória. Desta forma, o ritmo teta, que já foi bastante estudado pelo seu papel no aprendizado e na memória, e o ritmo delta, por seu envolvimento no ciclo sono-vigília, foram investigados considerando a relação causal entre eles. Ainda não está bem estabelecido como os ritmos delta e teta podem juntos contribuir nos processos cognitivos ou como os ritmos do hipocampo podem influenciar ou receber influências da atividade cortical. Neste trabalho foi investigada a contribuição dos ritmos delta e teta em função do estado comportamental (vigília ativa ou congelamento) e do tipo de memória evocada (recente ou remota). Além disso, foi realizada uma análise de sincronia de fase para inferir a dinâmica da atividade elétrica entre o córtex pré-frontal medial, o hipocampo e o córtex visual durante a evocação das memórias de medo. Para tanto, os animais foram treinados e testados numa tarefa de condicionamento de medo ao contexto. Neste tipo de condicionamento, o animal aprende a estabelecer uma associação entre um determinado contexto (caixa de condicionamento) e um evento aversivo (choque elétrico nas patas) que ocorreu neste contexto. Quando o animal foi reintroduzido na caixa de condicionamento, o mesmo exibiu uma série de respostas condicionadas incluindo a reação de congelamento. Os resultados mostraram que os ritmos delta e teta estão relacionados de forma específica às respostas comportamentais de medo e de evocação das memórias recente e remota. Observou-se no espectro de potências uma maior contribuição do ritmo teta durante a vigília exploratória, diminuindo durante o congelamento. Neste último, os ratos apresentaram um robusto aumento da contribuição do ritmo delta. Além disso, a medida de causalidade mostrou ser dependente do estado comportamental do animal. Finalmente, um aumento da sincronia entre o hipocampo e o córtex pré-frontal foi evidenciado durante a evocação de memória recente, contraposta à diminuição durante a evocação da memória remota. Estes resultados indicam que a sincronização da atividade elétrica cerebral pode refletir uma facilitação na comunicação neuronal.

Descritores: Memória de longo prazo/fisiologia; memória de curto prazo/fisiologia; Ritmo teta; Eletrofisiologia; Ondas encefálicas/fisiologia; Hipocampo; Córtex pré-frontal; Condicionamento clássico; Aprendizagem; Ratos.

Kunicki ACB. Cortico-hippocampal system dynamics during contextual fear conditioning [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011.

Summary

The establishment of long-term memories requires effective communication of the hippocampus to the neocortex. Electrophysiological activities between hippocampus and prefrontal cortex have shown higher theta synchronization during retrieval of aversive memories and lower during extinction learning. While theta activity is more differently related to learning and memory, delta waves have been more discussed in the context of sleep or "offline" states. Few studies have investigated delta waves during "on-line" states (such as task-relevant situations) and the contribution of these rhythms to memory storage remains unclear. We recorded electrophysiological data to study the contributions of delta and theta waves in cortico-hippocampal system of rats underwent to contextual fear conditioning. Our experiment consisted of environmental pre-exposition, training with electrical footshocks, and recent/remote memory tests. Two groups of rats were tested one or eighteen days post training for recent or remote memory, respectively. Local field potential time series of two behavioral states were sampled: active exploration and freezing. The results showed that theta and delta rhythms play an important role in behavioral responses and memory processing. They are related to fear recall and their contribution depend on the recent or remote memory. Additionally, using an order parameter we show that theta contribution is strongly pronounced in active exploration, decreasing during freezing. In the latter, the rats presented pronounced delta waves in freezing. Moreover, a behavioral-dependent causality measure showed an increase of theta influence in delta rhythms, resulting in a theta slowing in aversive memory retrieval. Finally, we show an increased synchrony between hippocampus and prefrontal cortex during recall of recent memory, but a decreased synchrony in remote memory. We proposed that synchronized activity may facilitate the communication of information and once the memories are established in the neocortex, the synchronization decreases, and recalling them becomes more independent of the hippocampus. We proposed that delta-theta oscillations of the hippocampus over neocortical areas reflect information processing during aversive memory retrieval.

Descriptors: Long-term memory/physiology; Short-term memory/physiology; Theta rhythm; Electrophysiology; Brain waves/physiology; Hippocampus; Prefrontal cortex; Classical conditioning; Learning; Rats.

1. INTRODUÇÃO

1.1 RITMOS CEREBRAIS

1.1.1 RITMO TETA

Uma faixa de frequência de grande interesse científico é representada pelo ritmo teta (4-12 Hz) que ocorre principalmente durante a vigília exploratória (Vanderwolf 1969; Gavrilov, Wiener 1995; Slawinska and Kasicki 1998) e o sono paradoxal (Timo-laria, Negrao 1970; Timo-laria, Yamashita 1990). Esta atividade foi descoberta por Jung e Kornmuller (1938) no eletroencefalograma de coelhos e, em seguida, estudada por Green e Arduini (1954) no hipocampo de gatos e alguns roedores. Posteriormente, o ritmo teta foi descrito em primatas e humanos durante a execução de tarefas que requerem processamento mnemônico, como navegação espacial (Ekstrom, Caplan 2005; Kahana, Sekuler 1999; Raghavachari, Kahana 2001) e operação aritmética (Sasaki, Tsujimoto 1994; Sasaki, Tsujimoto 1996). Em roedores, a atividade teta tem sido relacionada a diversos comportamentos, como locomoção, ingestão de alimentos e bebidas (Vanderwolf 1969), além de um importante papel no aprendizado e na memória (Yamaguchi 2003; Wiebe and Staubli 2001; Bastiaansen and Hagoort 2003).

A relação entre a atividade teta e o aprendizado foi inicialmente estudada por Morrel (1961). Seus experimentos com EEG cortical mostraram que a frequência teta está associada a breves estágios de condicionamento em carnívoros. Isto levou Morrel (1961) a concluir que esta atividade pode estar correlacionada com a inscrição de uma experiência numa estrutura neural.

Estudos realizados por Elazar e Adey (1967) confirmam a hipótese de Morrel (1961) ao mostrar que alterações na frequência teta hipocampal durante o treinamento estão correlacionadas com o grau de aprendizado numa tarefa de memória espacial. Baseado neste resultado esses autores sugerem que a atividade teta está criticamente envolvida nos processos de aprendizado e memória. Esta hipótese é consistente com estudos que observaram uma correlação positiva entre a das ondas teta e o grau de retenção ao teste numa tarefa de esquiva inibitória (Landfield and McGaugh 1972; Landfield 1976).

Pesquisas recentes apresentam evidências que o ritmo teta está envolvido em processos mnemônicos, pois sua inibição, seja por meio de lesões do septo medial ou pela administração de antagonistas colinérgicos, resulta em déficit no aprendizado e na memória (Winson 1978; McNaughton, Ruan 2006; Staubli and Lynch 1987; Huerta and Lisman 1993). Por outro lado, a estimulação elétrica do fórnix na faixa de frequência teta restaura a ritmicidade hipocampal e o aprendizado em ratos que foram submetidos ao bloqueio farmacológico do ritmo teta (McNaughton, Ruan 2006). Além disso, vários trabalhos têm mostrado que a estimulação elétrica artificial na frequência teta (5-7 Hz) facilita a plasticidade sináptica, assim como induz a potencialização de longa duração (*long-term potentiation* - LTP) no hipocampo (Vertes and Kocsis 1997; Huerta and Lisman 1995; Greenstein, Pavlides 1988) ou a depressão de longa duração (*long-term depression* - LTD) na amígdala lateral (Heinbockel and Pape 2000). Neste sentido, a atividade teta pode representar um estado ótimo capaz de promover o

aumento da comunicação neural ou estabilizar a plasticidade durante a consolidação da memória (Heinbockel and Pape 2000).

A atividade sincronizada do ritmo teta no hipocampo e estruturas límbicas (Figura 1) relacionadas suporta a hipótese que isto seja um dos mecanismos de integração entre as estruturas neurais durante o processamento da informação (Rodriguez, George 1999; Kocsis, Di Prisco 2001). É possível que as vias que interconectam o hipocampo e o neocórtex usem este ritmo cerebral para transferência e coordenação da atividade neural em circuitos cortico-hipocampal durante o aprendizado e a consolidação da memória (Buzsaki 2005; Ribeiro, Gervasoni 2004; Ahmed, Dong 1995; Siapas, Lubenov 2005).

Devido ao grande número de regiões que contribui para geração do ritmo teta, sua origem estrutural permanece ainda um desafio para os pesquisadores. Além das estruturas do circuito de Papez (Figura 2) (Dalle-Lucca and Timo-laria 1992), o ritmo teta ocorre em diversas regiões corticais e subcorticais, como a área septal medial (Colom and Bland 1991), o núcleo supramamilar (Kirk and McNaughton 1991; Kocsis and Vertes 1994; Bland, Konopacki 1995), o córtex entorrinal (Mitchell, Rawlins 1982; Frank, Brown 2001), a amígdala basolateral (Heinbockel and Pape 2000), o núcleo dorsal da rafe (Kocsis and Vertes 1996; Viana Di Prisco, Albo 2002) e o córtex pré-frontal (Siapas, Lubenov 2005; Hyman, Zilli 2005). Entretanto, apenas o septo medial e núcleo supramamilar são considerados capazes de gerar independentemente oscilações teta mesmo após a separação do hipocampo (Oddie, Bland 1994; Kirk, Oddie 1996).

Figura 1: Representação esquemática das conexões do sistema límbico em humanos. O circuito de Papez inicia no córtex cingulado (1) que projeta para o hipocampo (2) via córtex entorrinal e giro parahipocampal (3). O fórnix (4) conecta o hipocampo com o corpo mamilar (5), que por sua vez projeta para o núcleo anterior do tálamo (6) via trato mamiló-talâmico (*). Por último, fibras talâmicas projetam para o giro do cíngulo completando o Circuito de Papez. Fonte: Martin (1989).

Estudos com lesões da área septal medial da banda diagonal de Broca eliminaram as ondas teta no hipocampo (Green and Arduini 1954) e em todas as regiões corticais (Petsche, Stumpf 1962). Isto levou vários pesquisadores a concluir que a área septal atuaria como “marcapasso” do teta hipocampal (Tombol and Petsche 1969; O’Keefe and Nadel 1978; Buzsaki 2002). Entretanto, a hipótese do “marcapasso” não foi definitivamente confirmada devido a algumas propriedades inconsistentes no modelo, como o fato de o teta septal ocorrer menos frequentemente que o teta hipocampal (Nerad and McNaughton 2006).

Orban *et al.* (2001) sugeriram que o hipocampo e a área septal controlam a atividade teta em outras estruturas, como o núcleo reticular pontino oral e a região supramamilar. Diversos estudos neuroanatômicos têm mostrado que o núcleo reticular pontino oral não projeta diretamente para a região septal (Vertes 1984; 1988), mas indiretamente via uma rede de conexões na qual o núcleo supramamilar pode ter uma importante função mediando influências de outras áreas sobre a formação septo-hipocampal na geração do ritmo teta (Kocsis and Vertes 1994).

O núcleo reticular pontino oral projeta para o núcleo supramamilar (Vertes 1988) e este envia projeções para o septo medial e lateral (Shepard, Mihailoff 1988; Vertes 1992), o hipocampo (Wyss, Swanson 1979) e o córtex entorrinal (Room and Groenewegen 1986). Além destas estruturas, o corpo mamilar, assim como o núcleo supramamilar estão intimamente conectados ao sistema septo-hipocampal (1979; Swanson and Cowan 1975; Gonzalo-Ruiz, Alonso 1992). Isto sugere que as estruturas do circuito de Papez também estão envolvidas no mecanismo de geração do ritmo teta (Kocsis and Vertes 1994; Azzaroni and Parmeggiani 1967; Vertes, Albo 2001). Desta forma, vários estudos têm investigado a dinâmica e a geração da atividade teta hipocampal, sua relação com outras estruturas límbicas (Buzsaki 2002; Lee, Chrobak 1994; King, Recce 1998; Kocsis, Bragin 1999; Denham and Borisyuk 2000; Wolansky, Clement 2006) e ritmos cerebrais visto que o teta hipocampal, na maior parte das vezes, está correlacionado ao ritmo gama (Stumpf 1965; Bragin, Jando 1995).

1.1.2 RITMO GAMA

O ritmo gama compreende uma faixa de frequência entre 30 e 80 Hz. Sua ocorrência foi inicialmente descrita por Adrian (1942; 1950) em estudos que realizaram a estimulação sensorial do bulbo olfatório e do córtex piriforme em gatos anestesiados. Posteriormente, o ritmo gama foi extensivamente estudado em animais despertos por Freeman (1975; 1981). Seus estudos mostraram que as ondas gama ocorrem principalmente durante estados comportamentais que envolvem expectativas como na atenção, na motivação e na excitação (Freeman and Skarda 1985). Os achados de Freeman foram confirmados por Bouyer, Montaron *et al.* (1981). Estes pesquisadores identificaram oscilações entre 40 e 50 Hz nas áreas parietal e frontal de gatos quando estes estavam em vigília atenta assistindo uma presa entrar em uma sala. Esses autores chamaram esta oscilação rápida de “ritmo de hipervigilância”.

Posteriormente, o ritmo gama foi observado no córtex visual primário, inicialmente em animais anestesiados (Gray, K'onig 1989; Gray, Engel 1992; Eckhorn, Bauer 1988), depois em alerta (Frien, Eckhorn 1994; Kreiter and Singer 1996; Gray and Viana Di Prisco 1997; Friedman-Hill, Maldonado 2000). Em ambos os casos, a atividade dos neurônios do córtex visual apresentou uma pronunciada ritmicidade em seu padrão de disparo em resposta a apresentação de um estímulo visual dentro de seu campo receptivo. Essas oscilações neuronais dependente do estímulo ocorreram principalmente na faixa de frequência gama, foram sincronizadas e estavam

ausentes durante a atividade espontânea (Eckhorn, Bauer 1988; Gray and Singer 1989; Engel, König 1990; Livingstone 1996; König, Engel 1995). Esses achados fortemente indicam que a sincronização na frequência gama pode desempenhar um importante papel na integração de informações sensoriais (Gray 1994; Singer and Gray 1995).

No hipocampo, as oscilações gama apresentam maior amplitude quando ocorrem em fase com o ritmo teta, indicando que estas oscilações podem ser parte de um sistema funcional comum (Bragin, Jando 1995; Buzsáki, Leung 1983; Leung, Lopes da Silva 1982). Experimentos mostram ainda que a variação da frequência das oscilações gama e teta estão correlacionadas, o que provê adicional evidência de sua inter-relação funcional (Bragin, Jando 1995).

Apesar da intrínseca relação, os ritmos teta e gama parecem ser gerados independentemente. O ritmo teta requer aferências da área septal medial (Vertes and Kocsis 1997), enquanto o ritmo gama parece ser gerado por dois sítios distintos, um localizado no giro denteado, que depende de aferências do córtex entorrinal (Bragin, Jando 1995) e outro que emerge de CA3 e se propaga para CA1 (Colgin and Moser 2010). É possível que estas oscilações desempenhem um papel fundamental no fluxo de informação entre as áreas cerebrais.

1.1.3 RITMO DELTA

O ritmo delta caracteriza-se por oscilações lentas entre 1 - 4 HZ que ocorrem no neocórtex, predominantemente no córtex pré-frontal (Wang 2010). Dados experimentais sugerem que o ritmo delta desempenha um papel semelhante às oscilações teta, ou seja, principalmente envolvida no processamento cognitivo (2000; Schürmann, Başar-Eroğlu 1995; Başar, Başar-Eroğlu 1999) e isso pode ocorrer durante a vigília e em estágios subseqüentes do sono (Marshall and Born 2007; Diekelmann, Wilhelm 2009).

Experimentos em humanos utilizando o paradigma de *oddball* mostram que as oscilações delta também exercem um importante papel na detecção do estímulo e na tomada de decisão (Başar, Başar-Eroğlu 1999; Başar-Eroğlu, Başar 1992). Este paradigma comportamental constitui um experimento clássico na obtenção de potenciais relacionados a eventos mensurados com uma latência de aproximadamente 300 milissegundos. Trata-se de uma tarefa envolvendo a discriminação de estímulos auditivos ou visuais distribuídos randomicamente entre estímulos não-alvo. Quando um estímulo visual é apresentado observa-se um aumento da amplitude da onda delta no lobo parietal, enquanto na presença de um estímulo auditivo observa-se um aumento do delta nas regiões central e frontal (Başar-Eroğlu, Başar 1992).

Mais recentemente, Stefanics, Hangya *et al.* (2010) usando uma tarefa de detecção de um estímulo auditivo em humanos, mostraram que

alterações no desempenho relacionadas a diferentes níveis de expectativa podem modular a fase das oscilações delta. Existe uma correlação positiva entre o nível de predição do sujeito e a sincronização de fase dos neurônios. Esses resultados sugerem que as oscilações delta podem desempenhar um papel fundamental nos mecanismos neurais que modulam a antecipação por facilitar uma eficiente comunicação entre grandes áreas neuronais relacionadas ao processamento sensorial e a execução da resposta.

1.2 APRENDIZADO E MEMÓRIA

O estudo experimental da memória teve início no século XIX, com o desenvolvimento da psicologia experimental. O pioneiro neste estudo foi Hermann Ebbinghaus que na década de 1880 realizou uma série de experimentos no qual o sujeito precisava memorizar uma lista de sílabas. Utilizando a si mesmo como sujeito experimental, Ebbinghaus aprendeu a lista de sílabas e, mais tarde, testou sua memória em diferentes intervalos de tempo. Também mediu o número de repetições necessários e quanto tempo era preciso para aprender novamente cada sílaba. Desta forma, Ebbinghaus descobriu que as memórias têm diferentes tempos de duração. Algumas duram pouco e são retidas por alguns minutos; outras duram muito e persistem por dias ou meses. E que a repetição faz com que as memórias durem por períodos mais longos. Com uma única sessão de treino, uma lista podia ser lembrada por poucos minutos, mas com repetições suficientes,

uma lista de sílabas poderia persistir na memória por dias ou semanas (Squire and Kandel 2003).

Müller e Pilzecker (1900), inspirados pelos trabalhos de Ebbinghaus, realizaram testes que envolviam a apresentação de pares de sílabas cuja lembrança deveria ocorrer após um determinado intervalo de tempo. Contudo, para um segundo grupo de voluntários foi oferecido uma lista distratora durante o intervalo de tempo entre a lista apresentada e a lembrança da primeira lista. Os pesquisadores notaram que os voluntários cuja lista distratora foi apresentada exibiram menor lembrança em relação ao grupo de voluntários sem desvio da atenção. Desta forma, Müller e Pilzecker (1900) demonstraram que a memória é altamente suscetível a interferência quando o aprendizado envolve características similares. Esses autores observaram ainda que testes posteriores eram afetados por testes prévios. Os voluntários lembravam de pares de sílabas apresentadas em testes realizados semanas antes, resultando em erros, pois novas combinações deveriam ser recordadas. A lembrança de combinações estudadas semanas antes evidencia que a memória persiste após o novo aprendizado. Desta forma, eles sugeriram que essa memória que dura por dias ou semanas fica consolidada com o passar do tempo (Lechner, Squire 1999).

Posteriormente, William James fez uma distinção entre as memórias de curta e de longa duração. As memórias de curta duração duram de segundos a minutos e são essencialmente uma extensão do momento presente. Ao contrário, a memória de longa duração pode persistir durante semanas, meses ou por toda uma vida (Squire and Kandel 2003).

Até então os pesquisadores acreditavam que parecia haver uma memória de curta duração, um tanto suscetível a interferências e uma memória de longa duração, robusta e resistente a interferências. Entretanto, a questão a respeito de onde essas memórias são armazenadas no cérebro ainda era desconhecido pelos pesquisadores.

Na década de 1920, Karl Lashley, tentou localizar em ratos o sítio de armazenamento no cérebro da memória espacial. Para tanto, Lashley fez incisões no córtex antes ou depois do animal aprender a tarefa. Em seguida, avaliou o desempenho do animal tentando correlacionar a extensão das lesões com o seu desempenho. Lashley descreveu que os prejuízos de aprendizagem e de memória se correlacionavam com a extensão da lesão, mas não com a sua localização. Este resultado favoreceu a hipótese de que as memórias estão distribuídas e não dispostas em áreas específicas do cérebro como propunham os frenologistas (Bear, Connors 2008).

Donald Hebb, para explicar o resultado de Lashley, sugeriu que grupamentos “*assemblies*” de células, distribuídos em grandes áreas do córtex trabalham juntos para representar a informação. Nesse grupamento, um determinado número de células interconectadas transmitirá a informação nela representada. Evidências adicionais mostraram que a memória está amplamente distribuída, mas que diferentes áreas armazenam diferentes aspectos da informação (Squire and Kandel 2003).

O estudo do paciente H.M. contribuiu significativamente para identificar os sítios de armazenamento da memória. Este paciente sofria de epilepsia do lobo temporal medial devido a um traumatismo craniano após

uma queda de bicicleta. Na tentativa de ajudar o paciente, os médicos decidiram remover a superfície interna daquela região em ambos os hemisférios incluindo regiões como o hipocampo e a amígdala. Esse tratamento foi efetivo quanto à epilepsia, mas H.M. passou a apresentar um déficit de memória do qual nunca se recuperou (Scoville and Milner 1957).

A amnésia exibida por H. M. era anterógrada, ou seja, ele era incapaz de formar novas memórias, e retrógrada, neste caso, temporalmente graduada, visto que lembranças da juventude e de eventos ocorridos até dois anos antes da cirurgia foram preservados (Scoville and Milner 1957). Apesar da amnésia, H. M. conseguia adquirir e reter diversas informações. Por exemplo, após a cirurgia H. M. aprendeu novas habilidades motoras visto que podia aprender a traçar o contorno de uma estrela por meio de um espelho, e ele aprimorava essa habilidade dia após dia, assim como acontecia em um indivíduo normal (Schmolck, Kensinger 2002; Corkin 1968).

As descobertas de Scoville e Milner (1957) mostraram que o hipocampo e outras estruturas do lobo temporal medial são fundamentais para a reverberação da atividade neural, que leva ao armazenamento de informações a cerca de eventos vividos. Essa reverberação é essencial para o armazenamento da informação sobre “o que” ocorreu, mas não sobre “como” desempenhar uma tarefa motora (Squire and Kandel 2003).

Essa diferenciação já havia sido feita por William James em 1890 com base na intuição e na introspecção. Em seu trabalho, *Princípios da Psicologia*, James distinguiu o hábito, uma ação mecânica e reflexa, da

memória, que envolve uma noção consciente do passado. Em 1924, William McDougall chamou o hábito de conhecimento implícito e a memória de conhecimento explícito, sendo o primeiro mais automático e reflexo, e último envolve a recordação consciente do passado (Squire and Kandel 2003; Bear, Connors 2008).

1.2.1 TIPOS DE MEMÓRIA

Existem ainda incertezas a respeito de quantos sistemas de memória diferentes há de fato. Apesar disso, surgiu um consenso sobre os principais sistemas de memórias. Podemos classificar as memórias, em relação ao seu conteúdo, em dois grandes grupos: as memórias declarativas ou explícitas (aquelas para fatos ou eventos e qualquer informação que possa ser expressa conscientemente) e as memórias procedurais ou implícitas, as quais envolvem basicamente habilidades motoras e/ou sensoriais, também chamadas de hábitos. Além da classificação quanto ao seu conteúdo, às memórias podem ser classificadas de acordo com a sua duração (curta ou longa) (Izquierdo, Barros 2002).

A memória de curta duração é processada de forma paralela à consolidação da memória de longa duração e pode ser suprimida pela administração de antagonistas no hipocampo (Izquierdo, Barros 1998; Izquierdo, Bevilaqua 2006; Izquierdo, Medina 1999) sem afetar a memória de longa duração (Izquierdo, Barros 1998).

As memórias de procedimentos são memórias de habilidades motoras ou sensoriais. Este tipo de memória é, em geral, implícita, pois depende das vias perceptivas e reflexas, assim como do núcleo caudado e do cerebelo. As memórias declarativas, explícitas e de longa duração, levam tempo para serem consolidadas e dependem do lobo temporal (Izquierdo, Barros 2002; Izquierdo, Barros 1998).

Um excelente paradigma comportamental para se estudar os mecanismos neurais envolvidos nos processos de aquisição, consolidação e evocação das memórias é o medo condicionado visto que o aprendizado ocorre em uma única sessão de treino e persiste por horas, dias ou até meses. Além disso, o medo permite estudar os mecanismos neurofisiológicos envolvidos no processamento das emoções.

1.3 MEDO

O medo é fundamental para a sobrevivência dos vertebrados superiores uma vez que ativa respostas comportamentais defensivas que protegem os animais e os humanos contra ameaças ambientais (Fendt and Fanselow 1999). Tal ameaça pode ser representada por um estímulo inato, como a presença de um predador ou um agressor da mesma espécie (Blanchard and Blanchard 1971), ou por estímulos neutros, que por associação com estímulos dolorosos ou outras sensações igualmente desagradáveis adquirem propriedades aversivas condicionadas (Blanchard and Blanchard 1972; Graeff and Brandão 1999).

Quando um animal é confrontado com uma ameaça a sua integridade física ou à própria sobrevivência, seja esta representada por um predador, um agressor da mesma espécie ou por uma simples mudança no ambiente, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Esse conjunto de respostas, características da espécie, foi chamado de reações de defesa espécie-específica uma vez que foi previamente determinado em seu código genético (Bolles 1970).

Os ratos, por exemplo, apresentam três tipos de respostas defensivas inata como congelamento, fuga ou luta. A determinação de qual comportamento é produzido depende da experiência prévia do animal (Bolles, Uhl 1975). Entretanto, isto requer que o animal seja exposto a uma série de estímulos aversivos antes de aprender a estratégia correta, o que é pouco provável numa situação natural (Fanselow, Sigmundi 1987).

Visto que algumas idéias de Bolles (1976) na prática não se aplicavam, Blanchard *et al.* (1976) propuseram que as respostas de defesa inata variam em função das características do ambiente. Desta forma, o animal tenta escapar de uma situação de perigo se o escape é possível, luta se um alvo para o combate existe ou entra em congelamento quando percebe que o escape não é possível. Esta hipótese corrobora com experimentos que mostraram que os animais que receberam um choque elétrico imediatamente após terem sido colocados numa caixa de condicionamento não apresentam resposta de congelamento. Por outro lado, os animais que receberam o choque elétrico 3 minutos após terem sido

colocados na caixa de condicionamento e, que talvez tenham aprendido que não há como escapar, apresentam resposta de congelamento (Blanchard, Fukunaga 1976).

Assumindo esta postura de congelamento talvez o animal não seja percebido pelo predador (Brandão, Troncoso 2003). Além disso, os predadores estão mais propensos ao ataque quando o animal está em movimento. Portanto, o movimento pode atuar como um estímulo ao ataque do predador. Por isso, provavelmente o congelamento é observado mesmo em situações que o animal tem oportunidade para outros comportamentos como a fuga (Fanselow and Lester 1988). Porém, à medida que o predador se aproxima, ou aumenta a intensidade dos sinais que indicam a sua presença, o animal altera o seu o comportamento de um congelamento intenso para um comportamento de luta ou fuga, quando esta é possível (Brandão, Troncoso 2003).

Esses trabalhos levaram Fanselow e Lester (1988) a sugerir que o comportamento defensivo é organizado em função de uma contínua percepção da ameaça e da eminência do predador que é influenciada por fatores como a distância espacial da ameaça e o risco temporal de contato com o predador. Posteriormente, foi proposto que a intensidade do medo que o animal está enfrentando também determina o tipo de resposta comportamental do animal (Fanselow 1980). Uma vez que a taxa de congelamento varia em função da intensidade do choque e do número de treinos. (Fanselow 1979; Young and Fanselow 1992).

Além do comportamento de congelamento, luta ou fuga, as respostas defensivas são acompanhadas de intensas alterações neuroendócrinas e autonômicas. No sistema nervoso central, há ativação dos sistemas monoaminérgicos, resultando na liberação de neurotransmissores como norepinefrina, acetilcolina, serotonina e dopamina. Esses neurotransmissores promovem um aumento do estado de alerta, e em geral, favorecem o processamento dos estímulos externos (Aston-Jones and Cohen 2005; LeDoux 2007; Rodrigues, LeDoux 2009).

As alterações do sistema neuroendócrino estão relacionadas ao estresse vivido pelo animal. Há liberação de glucocorticóides pelo córtex adrenal e catecolaminas da medula adrenal e nervos do sistema simpático. Esses hormônios relacionados ao estresse, por um mecanismo de retroalimentação, influenciam outras estruturas neurais envolvidas na emoção e na cognição (Rodrigues, LeDoux 2009).

Por outro lado, a detecção do medo tem consequências autonômicas. As conexões da amígdala para o tronco encefálico ativam o sistema nervoso simpático, provocando a liberação de epinefrina e norepinefrina na medula adrenal e norepinefrina nos terminais de nervos simpáticos por todo o corpo. Os hormônios medulares da adrenal e do sistema nervoso simpático produzem uma série de efeitos como aumento da pressão arterial, aumento da frequência cardíaca e respiratória, aumento da irrigação sanguínea dos músculos esqueléticos e inibição da digestão (Rodrigues, LeDoux 2009).

A taquicardia associada ao aumento da pressão nos vasos sanguíneos leva a um aumento no débito cardíaco e este por sua vez permite que a musculatura esquelética suporte o súbito esforço físico necessários para a possível fuga ou luta (Bolles and Fanselow 1980). Os efeitos hipertensivos são mais consistentes que o efeito sobre a frequência cardíaca, uma vez que ambos, taquicardia (LeDoux, Sakaguchi 1984) e bradicardia (Richardson, Wang 1995), já foram descritos na literatura. É possível que esta variação ocorra em função do tipo de condicionamento (Iwata and LeDoux 1988) e da linha de base usada para a frequência cardíaca (Fendt and Fanselow 1999). Outros efeitos autonômicos incluem dilatação da pupila, pilo ereção, micção, defecação e exoftalmia (Graeff and Brandão 1999).

Ainda, o medo, produzido por estímulos aversivos associados a eventos dolorosos resulta na inibição da dor. Acredita-se que a analgesia ocorra porque o medo torna-se prioridade inibindo o sistema envolvido na percepção da dor. Essa inibição é mediada por um mecanismo endógeno que envolve as endorfinas, inibindo a motivação, a dor e os comportamentos que possam competir com o comportamento defensivo eficaz. (Bolles and Fanselow 1980).

Há outras alterações comportamentais que caracterizam as respostas de medo. Por exemplo, os ratos apresentam vocalização ultrasônica (Kaltwasser 1991; Miczek, Weerts 1995). A amplitude, a duração e o número de vocalizações estão diretamente relacionados à intensidade do estímulo não-condicionado (choque). Por outro lado, a latência das

vocalizações tem se mostrado inversamente relacionada à intensidade do choque (Borszcz 1995). Desta forma, o termo “medo” refere-se à ativação de respostas comportamentais defensivas que dão origem a esta gama de reações a estímulos aversivos (Fendt and Fanselow 1999; LeDoux 1996) cada qual com um substrato neural específico.

1.4 MEDO CONDICIONADO

O condicionamento de medo foi primeiramente descrito pelo psicólogo russo Ivan Pavlov no início do século XX e também é conhecido como condicionamento clássico ou pavloviano. Esta tarefa consiste na apresentação de um estímulo condicionado, inicialmente neutro (luz, som ou contexto, por exemplo) pareado a um estímulo incondicionado de natureza aversiva, como um choque elétrico nas patas. Após esse pareamento, a apresentação do estímulo, que inicialmente era neutro, prediz a ocorrência do choque e então passa a atuar como um estímulo condicionado, desencadeando uma resposta condicionada, o congelamento (“*freezing*”). E este pode ser definido como a imobilidade total acompanhado de postura tensa, ou seja, ausência total de movimentos exceto aqueles associados com os movimentos respiratórios (Bolles and Collier 1976; Griffith 1920; Small 1899; Darwin 1960).

O medo condicionado é especialmente útil para estudar os mecanismos neurais do medo porque a circuitaria pode ser descrita em termos de vias que processam desde o estímulo sensorial condicionado ao

sistema motor que gera a resposta de congelamento. O elo entre estas duas circuitarias é a amígdala, que se situa entre a entrada sensorial e a saída motora. Entretanto, outras estruturas também contribuem de forma significativa para o condicionamento de medo (Rodrigues, LeDoux 2009).

1.5 CIRCUITARIA NEURAL ENVOLVIDA NO MEDO CONDICIONADO

A circuitaria neural responsável pelo medo condicionado envolve informações sensoriais multimodais que chegam à porção basolateral da amígdala através de projeções diretas provenientes do hipocampo (Figura 2). A amígdala possui um importante papel na regulação do comportamento defensivo. Lesões desta estrutura provocam a inibição das reações de medo elicitado pela apresentação de um estímulo aversivo ou um estímulo previamente pareado com o choque elétrico nas patas (Blanchard and Blanchard 1972; Kim, Rison 1993). Outras respostas condicionadas como hipertensão, bradicardia e analgesia também são bloqueadas após a lesão da amígdala (Kapp, Frysinger 1979; LeDoux, Iwata 1988; Helmstetter and Bellgowan 1993). Desta forma, a amígdala parece estar envolvida na regulação de um estado motivacional-emocional necessário para elicitar as reações de defesa típicas da espécie (Blanchard and Blanchard 1972).

A amígdala contém uma grande heterogeneidade de núcleos que diferem em função do tipo celular, densidade, composição química e conectividade (LeDoux 2007; SWANSON 2003; Pitkänen, Pikkarainen 2000). Os núcleos da amígdala podem ser divididos em três grupos: os núcleos

profundos ou basolateral da amígdala, que inclui o núcleo lateral, o núcleo basal e o núcleo basal acessório; os núcleos superficiais ou corticais, que inclui os núcleos do trato olfatório lateral e o núcleo cortical; e os núcleos do grupo centromedial, composto pelos núcleos medial e central. Existe um conjunto separado de núcleos que não se enquadram em qualquer destes grupos que são os núcleos intercalados da amígdala e a área amígdalohipocampal (Figura 3).

Figura 2: Circuito primário envolvido no condicionamento de medo ao contexto. Informações sensoriais multimodais a cerca do contexto são enviadas do hipocampo, tálamo e córtex somatossensorial para o núcleo lateral da amígdala. A partir da amígdala, um circuito descendente para a medula espinhal gera respostas condicionadas, como o congelamento e a analgesia. Fonte: Adaptado de Fanselow (2009).

Figura 3: Região amidalóide do rato delimitada pelo retângulo. À esquerda observa-se uma sessão coronal (posição em relação ao bregma ântero-posterior -3,00 mm) corada com o corante de Nissl. Ao centro, a região do complexo amidalóide. À direita, núcleos do complexo amidalóide. Núcleo lateral (LA), núcleo basal (B), basal acessório (AB) e o núcleo central que pode ser dividido nas regiões lateral (CeL) e medial (CeM). Cápsula externa (e.c.) Fonte: Sah, Faber *et al.* (2003).

O núcleo lateral (LA) é considerado a entrada sensorial para a amígdala porque recebe aferências auditiva, visual, gustatória, olfatória e somatossensorial (incluindo dor) do tálamo e do córtex. O LA recebe informações sensoriais acerca do estímulo condicionado via tálamo e córtex. A via tálamo-amidalóide transmite a informação sobre o estímulo aversivo de forma rápida e sem o controle consciente do indivíduo (LeDoux 1996; LeDoux 1995). Por outro lado, a via cortico-amigdalóide, provê lenta e mais detalhada informação sensorial. Neurônios do LA respondem tanto ao estímulo condicionado como ao estímulo não-condicionado, e o bloqueio farmacológico ou lesões deste núcleo, impossibilitam o condicionamento de medo (LeDoux 1996).

Acredita-se

que a amígdala recebe informações sobre estímulos visuais aversivos por meio de duas vias. Os estímulos visuais são processados primeiramente pelo núcleo geniculado lateral do tálamo, que transmite a informação direto para amígdala. Essa transmissão rápida permite a resposta imediata ao possível perigo. Enquanto isso, o córtex visual, também recebe informações do tálamo e, com um percentual maior de sofisticação e tempo, determina o grau de ameaça do estímulo. Dependendo de sua aversividade, esta informação é retransmitida à amígdala levando a um aumento na frequência cardíaca, na pressão arterial e contração muscular. Porém, se o animal avaliar que o perigo não representa risco, uma resposta de supressão do congelamento de medo será enviada a amígdala (LeDoux 1994).

Por outro lado, o núcleo central (CE) é considerado a maior via de saída da amígdala. O CE é responsável pelo controle da reação de medo que inclui respostas comportamentais autonômicas e endócrinas via projeções para o hipotálamo, a substância cinzenta central e o núcleo motor dorsal do vago (LeDoux 2007; LeDoux 1996; LeDoux 1995; Fanselow and Poulos 2005; Lang and Davis 2006; Maren 2001; Paré, Quirk 2004; Rodrigues, Schafe 2004). Assim, projeções para o hipotálamo lateral e o bulbo medeiam as respostas autonômicas. O núcleo paraventricular do hipotálamo media respostas neuroendócrinas, o núcleo reticulopontino caudal está relacionado à resposta de sobressalto e as projeções para a substância cinzenta periaquedutal são críticas para o congelamento e a nocicepção (LeDoux 1996). Desta forma, observa-se que cada uma dessas

respostas é controlada por um grupo diferente de eferências oriundas do NCe.

O CE comunica-se diretamente com o LA, mas as conexões entre esses núcleos são modestas e outros núcleos amigdalóides também auxiliam mediando as conexões entre esses dois núcleos. Por exemplo, o LA projeta para o núcleo basal (B), que por sua vez projeta para o CE (LeDoux 2000; Pitkänen, Savander 1997). Os núcleos LA e B também projetam para os núcleos intercalados da amígdala, uma rede inibitória que se conecta com o CE (Paré, Quirk 2004; Likhtik, Popa 2008). Os neurônios de projeção do CE tendem a ser inibitórios, assim projeções do LA e do B para os núcleos intercalados podem estimular a inibição de neurônios do CE possibilitando a expressão das respostas de medo (LeDoux 2007). Além disso, o B projeta para o estriado (McDonald Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat 1991). Esta projeção está envolvida no comportamento de fuga (LeDoux 2007). A informação sobre o contexto numa situação de medo é transportada aos LA e B pelo hipocampo (Pitkänen, Pikkarainen 2000; Ji and Maren 2007; Phillips and LeDoux 1992; Kim and Fanselow 1992). Assim, embora o condicionamento de medo a um estímulo sensorial discreto, como o som ou a luz, são hipocampo independentes, o condicionamento ao contexto, incluindo detalhes sobre o ambiente, são hipocampo dependentes.

O LA e o B são interconectados a uma grande variedade de áreas corticais como o córtex pré-frontal e áreas de associação polimodal

(Pitkänen, Pikkarainen 2000; McDonald 1998; McDonald, Mascagnia 1996; Price 2003). Essas conexões possibilitam processos cognitivos de ordem superior, assim como regulação da emoção, cognição, associações complexas e imaginação (Rodrigues, LeDoux 2009).

Embora o LA seja requerido para o condicionamento de medo, parece que, com o treinamento intensivo, o condicionamento pode ser mediado por circuitos que não dependem do LA (Lee, Dickinson 2005; Maren 1999). Com o treinamento intenso, fracas conexões para o CE parecem induzir o medo condicionado (Zimmerman, Rabinak 2007), mas tais vias não são usadas normalmente (Rodrigues, LeDoux 2009). Além disso, embora o B não seja necessário para o condicionamento, ainda assim parece contribuir para o aparecimento da resposta de medo (Anglada-Figueroa and Quirk 2005).

Alguns autores sugerem que em determinadas condições, especialmente aquelas envolvendo o uso de respostas instrumentais, o CE pode mediar o condicionamento independente do LA (Balleinea and Killcrossb 2006; Cardinal, Parkinson 2002). Entretanto, esta conclusão é extrapolada, em grande parte com base em constatações de experimentos durante o condicionamento apetitivo e precisa ser estudada de forma sistemática no condicionamento aversivo (Rodrigues, LeDoux 2009).

Vários trabalhos indicam ainda que a substância cinzenta periaquedutal está envolvida na integração e na elaboração de estados motivacionais aversivos, sendo que a porção ventral apresenta grande importância na regulação do comportamento defensivo. Lesões eletrolíticas

da substância cinzenta periaquedutal ventral provocam uma diminuição na resposta de congelamento e um aumento da atividade exploratória (Fanselow, DeCola 1995; De Oca, DeCola 1998).

A expressão das respostas de medo também pode ser regulada pelo córtex pré-frontal medial através de projeções para o NLa (Quirk, Garcia 2006; Rosenkranz, Moore 2003; Sotres-Bayon, Bush 2004). Muitos pesquisadores têm debatido sobre o papel das interações pré-frontal-amígdala na aquisição, consolidação e extinção da memória aversiva (Quirk, Garcia 2006; Rosenkranz, Moore 2003; Sotres-Bayon, Bush 2004).

1.5.1 CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL

O córtex pré-frontal medial (PFCm) tem um papel fundamental na regulação do condicionamento aversivo (Gibbs and Powell 1988; Quirk, Russo 2000; Disterhoft and Olds 1972). Considerando que o CPFm compreende várias sub-regiões (Figura 4), distintas por suas conexões anatômicas, é possível que cada uma delas desempenhe um papel na expressão e na extinção das memórias aversivas.

Estudos eletrofisiológicos sugerem que o córtex infra-límbico (IL) e o córtex pré-límbico (PrL) tem influências opostas sobre a expressão do medo. Gilmartin e Mcechron (2005) registraram a atividade elétrica de neurônios individuais em PrL e IL durante uma tarefa de medo condicionado a um estímulo auditivo (*“trace fear conditioning”*). Os neurônios do PrL mostraram significativo aumento da atividade tanto ao estímulo condicionado

(Shadlen and Newsome) como ao estímulo não-condicionado (choque), enquanto os neurônios do IL mostraram um decréscimo na atividade em resposta a esses estímulos. Resultados semelhantes foram publicados por Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez *et al.*(2006). Esses pesquisadores mostraram que a microestimulação elétrica do PrL, ao contrário do IL, aumenta a expressão das respostas condicionadas de medo e evita a extinção.

Crescentes evidências indicam que PrL é necessário para a produção das respostas de medo. E que IL é necessário para a inibição destas respostas (Quirk, Garcia 2006; Sotres-Bayon, Cain 2006). Ambas as regiões, IL e PrL, exercem as suas influências através da amígdala. Isto sugere que a amígdala necessita das informações oriundas do PFCm para dirigir as respostas de medo (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano 2010). Desta forma, PrL excita as eferências da amígdala, enquanto IL inibe, o que indica uma modulação bidirecional das respostas de medo pelo PFCm (Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez 2006).

Figura 4: Representação esquemática de sessões coronais através do córtex frontal do rato. O córtex frontal compreende uma região medial (PFCm) e uma região orbital (CFO). As regiões do CPFm incluem o córtex cingulado anterior porções dorsal (Cg1) e ventral (Cg2), córtex pré-límbico (PrL), córtex infra-límbico (IL) e o córtex orbital medial (MO). O córtex frontal orbital inclui as regiões orbitais lateral (LO) e ventral (VO) e o córtex insular agranular. Fonte: Adaptado de Paxinos e Watson (1998).

1.5.2 CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO

Estudos indicam que o PrL desempenha um papel fundamental na eliciação do medo (Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez 2006; Blum, Hebert 2006; Choi, Maguschak 2010). O bloqueio farmacológico restrito ao PrL reduz as respostas de medo condicionado (Blum, Hebert 2006) assim como a estimulação elétrica do PrL aumenta a resposta condicionada (Vidal-Gonzalez, Vidal-Gonzalez 2006), embora não tenha efeito sobre a expressão inata do medo (Corcoran and Quirk 2007) ou ao desenvolvimento de plasticidade relacionada ao condicionamento (Laurent and Westbrook 2009). Portanto, a atividade do PrL é necessária para a expressão do medo mas não para a plasticidade na amígdala ou em outras estruturas.

O PrL recebe aferências sensoriais do LA e do B (McDonald Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat 1991; Laviolette, Lipski 2005; Herry, Ciocchi 2008), bem como do hipocampo e outras estruturas corticais envolvidas no medo condicionado ao contexto (Maren, Aharonov 1997; Thierry, Gioanni 2000), e projeta de volta para NBa (McDonald, Mascagnia 1996; Vertes 2004; Likhtik, Pelletier 2005). Esta projeção é necessária para a expressão do medo.

Os neurônios do LA são responsáveis por desencadear as respostas de medo, entretanto essas respostas duram apenas alguns milésimos de segundo (Maren and Quirk 2004; Quirk, Repa 1995; Paré and Collins 2000), e portanto, não podem ser responsáveis pela manutenção das

respostas de congelamento. Os neurônios do PrL, ao contrário, mostram um duradouro aumento em sua atividade que reflete a evolução temporal do medo (Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez 2009).

Outra questão importante é se o PrL pode influenciar a extinção do medo. A atividade dos neurônios do PrL é maior em ratos que não conseguem extinguir a memória (Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez 2009; Knapska and Maren 2009), e diminui após a administração de bloqueadores da expressão de medo como o propranolol (Rodriguez-Romaguera, Sotres-Bayon 2009) e o canabidiol (Lemos, Resstel 2010). Inúmeras evidências indicam que o IL é fundamental para a extinção do medo condicionado (Quirk, Garcia 2006; Quirk and Mueller 2008). Contudo, déficits na extinção do medo também podem ocorrer em função do bloqueio farmacológico ou de lesões do IL ou resultar da estimulação elétrica do PrL (Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez 2009).

1.5.3 CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR

O córtex cingulado anterior (ACC) participa, segundo Papez (1937), de um complexo circuito dentro do sistema límbico envolvido nos mecanismos da emoção. Entretanto, recentes estudos têm mostrado que ACC está envolvido além da emoção, em funções autonômicas, músculo-esquelético e endócrinas, além de um importante papel na cognição. Essas funções incluem respostas a estímulos dolorosos (Johansen, Fields 2001),

comportamento materno (Lorberbaum, Newman 2002) e vocalização associada à expressão de estados motivacionais (Sander, Frome 2007).

Vários estudos têm investigado o papel do ACC na modulação da nocicepção (Duquette, Roy 2007; Yang, Shih 2006). Imagens de ressonância magnética funcional e tomografia por emissão de pósitrons têm mostrado que a atividade neural no ACC aumenta após estimulação nociceptiva (Hurt and Ballantine 1974). A estimulação nociceptiva em tarefas como o medo condicionado ao contexto e a esquia inibitória está associada a um forte componente emocional. Desta forma, é possível que o ACC tenha um importante papel modulando a consolidação da memória em aprendizados aversivos (Johansen, Fields 2001; Kung, Su 2003).

Em outros paradigmas, como no labirinto aquático, que não envolve estimulação nociceptiva, lesões ou administração de antagonistas colinérgicos na porção rostral do córtex cingulado anterior (ACCr) não provocam nenhum efeito sobre aprendizado do animal (Riekkinen, Kuitunen 1995; Ragozzino and Kesner 1998; Kesner and Ragozzino 2003). Entretanto, dependendo da tarefa diferentes áreas são ativadas, o que sugere uma divisão do CCA em regiões funcionalmente distintas, a porção rostral (ACCr) e a porção caudal (ACCc), que estão envolvidas em tarefas emocionais e cognitivas, respectivamente (Bush, Whalen 1998; Davis, Taylor 2005; Phan, Liberzon 2003; Whalen, Bush 1998).

Lesões da porção rostral provocam diminuição do aprendizado numa tarefa de preferência condicionada por lugar (*conditioned place preference*) induzida por meio de injeções de formaldeído nas patas

posteriores do rato. Entretanto, quando foi utilizado um estímulo não-nociceptivo, como injeção de kapa-opióide, não se observou nenhum efeito sobre o aprendizado (Johansen, Fields 2001). Da mesma forma, na tarefa de condicionamento clássico na qual um tom é pareado a um pulso de laser de CO₂ na pata posterior também se observou déficit no aprendizado em animais com lesões do ACCr (Kung, Su 2003). Entretanto, lesões do ACCc não provocam nenhum efeito sobre o aprendizado nestes paradigmas (Johansen, Fields 2001; Kung, Su 2003). Resultado semelhante foi encontrado por Malin et al. (Malin, Ibrahim 2007) ao administrarem agonistas colinérgicos no ACC numa tarefa de esquiva inibitória.

Adicionalmente, Johansen e Fields (Johansen and Fields 2004) usando uma tarefa de preferência condicionada por lugar relataram que a administração de agonistas glutamatérgicos no ACCr de ratos durante o condicionamento induz aprendizado de esquiva na ausência do estímulo aversivo. Enquanto a administração de antagonistas glutamatérgicos bloqueia o aprendizado elicitado pelo estímulo aversivo. Além disso, lesões feitas após o condicionamento não prejudica o aprendizado, o que sugere um possível envolvimento do ACCr apenas durante a aquisição.

Inúmeras evidências indicam que apenas o ACCr está envolvido na consolidação da memória em tarefas que envolvem estimulação nociceptiva. Entretanto, as interconexões do ACC com outras regiões límbicas, como hipocampo, amígdala, corpo estriado ventral, hipotálamo (Devinsky, Morrell 1995; Allen and Hopkins 1989; Cassell and Wright 1986) e regiões envolvidas na modulação da dor como tálamo medial e substância

cinza periaquedutal (Royce 1983; Wyss and Sripanidkulchai 1984) sugere que o ACC pode influenciar ou receber influência de outras áreas do cérebro que estão envolvidas no processamento da informação emocional durante o aprendizado aversivo.

1.5.4 HIPOCAMPO

Diversos trabalhos sugerem o envolvimento do hipocampo na aquisição do aprendizado, visto que lesões desta estrutura diminuem o desempenho do animal em tarefas que requerem a aprendizagem de relações espaciais como durante o condicionamento de medo ao contexto (Anagnostaras, Gale 2001; Rudy, Barrientos 2002; Rudy and Matus-Amat 2005).

O treinamento clássico neste paradigma de aprendizado é realizado por meio da exposição do animal a um evento aversivo em um determinado contexto durante um único treino. Inúmeras evidências indicam que esta associação não pode ser formada se o rato não explora suficientemente o contexto antes de receber o choque (Fanselow 1990). Este fenômeno é conhecido como déficit imediato ao choque (*immediate shock deficit*). Entretanto, a pré-exposição ao contexto 24 horas antes de aplicar o choque no animal evita este déficit (*context preexposure facilitation effect*) (Fanselow 1990; Kiernan and Westbrook 1993).

Lesões, tanto eletrolítica quanto neuroquímica, administração de lidocaína ou antagonistas colinérgicos no hipocampo antes ou após o

treinamento prejudicam a resposta de congelamento no condicionamento de medo ao contexto e na esquia inibitória (O'Keefe and Nadel 1978; Kim, Rison 1993; Phillips and LeDoux 1992; Kim and Fanselow 1992; McIntyre, Miyashita 2005; Ammassari-Teule, Pavone 1991; Maren and Fanselow 1997; Rogers and Kesner 2004; Sacchetti, Lorenzini 1999; Roozendaal and McGaugh 1997; Roozendaal, Nguyen 1999). Entretanto, quando outro estímulo é aplicado, como um tom, a administração de antagonistas glutamatérgicos no hipocampo seletivamente diminui o aprendizado ao contexto, mas não ao tom (Rogers and Kesner 2004; Frohardt, Guarraci 1999). Adicionalmente, lesões no hipocampo após o treinamento não prejudicam a retenção se os ratos forem expostos previamente ao contexto (Rudy, Barrientos 2002; Roesler, Vianna 1998).

Esses resultados sugerem que o hipocampo pode estar seletivamente envolvido no aprendizado contextual e não é necessário para a subsequente associação do contexto ao estímulo aversivo (Kim, Rison 1993; Rudy, Huff 2004). Por outro lado, experimentos realizados recentemente por Chang et al. (Chang, Chen 2007) mostraram resultados opostos. Esses pesquisadores, usando uma tarefa de condicionamento de medo ao contexto mostraram que a administração de lidocaína no hipocampo antes ou após o treinamento prejudica a retenção da memória tanto após a exposição ao contexto como após a exposição ao estímulo aversivo.

Malin e McGaugh (2006) propuseram o diferencial envolvimento de múltiplas estruturas neurais na consolidação da memória ao contexto e

ao estímulo aversivo. Esses autores, usando uma tarefa de esquivas inibitória modificada mostraram que a administração de agonistas colinérgicos no hipocampo após a exposição ao contexto aumenta a retenção, entretanto quando administrado após o treinamento aversivo não se observou nenhum efeito sobre o aprendizado. Resultado inverso foi encontrado quando se administrou o mesmo agonista colinérgico na porção rostral do córtex cingulado anterior. Neste caso, observou-se melhora do aprendizado quando administrado após a apresentação do estímulo aversivo, mas não após a exposição ao contexto. Por outro lado, a administração deste agonista na amígdala basolateral aumenta a retenção da memória tanto após a exposição ao contexto como ao estímulo aversivo. Desta forma, é possível que o hipocampo e o córtex cingulado anterior estejam seletivamente envolvidos na consolidação da memória ao contexto e ao estímulo aversivo, respectivamente. Enquanto a amígdala basolateral pode estar envolvida na associação do contexto ao choque (Fanselow and Kim 1994; Maren and Fanselow 1996; Sanders, Wiltgen 2003).

Está bem estabelecido que o hipocampo tem um importante papel na aquisição da memória ao contexto (O'Keefe and Nadel 1978; Phillips and LeDoux 1992; Kim and Fanselow 1992; Rogers and Kesner 2004). Entretanto, se ele também está envolvido na associação do contexto ao estímulo aversivo ainda é controverso. Alguns autores têm sugerido que o papel do hipocampo no medo condicionado seria o de promover a transferência de uma configuração espacial do contexto para a amígdala, onde ocorreria então, a sua associação com os choques, determinando o

processo de condicionamento (Fendt and Fanselow 1999; Sutherland and McDonald 1990).

1.5.5 CONEXÕES ENTRE O HIPOCAMPO E O CPFm

Em ratos, o PFCm está diretamente conectado a duas estruturas da formação hipocampal, a região CA1 e o subiculum. Esta via é organizada topograficamente ao longo do eixo longitudinal e transversal do hipocampo (Jay and Witter 1991). Os neurônios da região CA1, exceto na parte mais dorsal do hipocampo, e os neurônios de toda a extensão dorsoventral da região proximal do subiculum (próximo a CA1), inervam o PFCm (Otani 2004).

A região CA1 e o subiculum projetam tanto para o PFCm, ou seja, as áreas pré-límbica, infralímbica e medial orbitária (Jay and Witter 1991) como para a região lateral do PFC (Verwer, Meijer 1997). As fibras do hipocampo cursam através da fimbria e do fórnix para alcançar o septo lateral, o núcleo accumbens, e as diversas subdivisões do PFCm. Nessas áreas, as fibras do hipocampo e os terminais estão presentes em todas as camadas de células, mas são mais densamente distribuídas nas camadas V e VI da região ventral da área pré-límbica. Essa via é ipsilateral e unidirecional, duas características que são de particular relevância para as funções do córtex pré-frontal (Otani 2004).

Embora haja variações consideráveis entre as espécies, foi recentemente mostrado que as áreas orbital e medial do PFC são

relativamente comparáveis entre as espécies, devido à semelhança topográfica e as conexões dessas duas sub-áreas (Öngür and Price 2000).

As conexões entre o hipocampo e o PFC estão de acordo com esta hipótese, pelo menos, quando comparados ratos e macacos. Nos primatas, as fibras do hipocampo originam-se principalmente da região rostral (entre CA1 e o subiculum) e termina nas regiões orbital e medial do PFC (Barbas and Blatt 1995; Carmichael and Price 1995). Em primatas, o hipocampo rostral pode ser considerado equivalente ao hipocampo ventral do rato. Portanto, pode-se concluir que existe uma organização similar das projeções do hipocampo para o PFC em ratos e macacos. Além disso, a forte influência do PFC sobre o hipocampo em primatas não é direta, passa pelo córtex parahipocampal (Carmichael and Price 1995; Goldman-Rakic, Selemon 1984). Ainda, todas as regiões do PFCm projetam densamente para o núcleo reuniens do tálamo. O núcleo reuniens é a principal fonte de aferências talâmicas para a formação hipocampal. Portanto, existem projeções indiretas do PFCm ao hipocampo. Isto sugere que o núcleo reuniens é um relé crítico na transferência de informação do PFCm para o hipocampo. Ainda, o PFCm projeta intensamente para vários outros núcleos talâmicos, principalmente para o médio dorsal do tálamo, o que sugere que estes núcleos talâmicos, assim como o núcleo reuniens, são uma importante via de saída para o PFCm atuar em diversas outras estruturas corticais e subcorticais (Cenquizca and Swanson 2007).

Os mecanismos pelos quais o hipocampo influencia ou recebe influência de outras estruturas neurais como o ACC, o PFCm e a amígdala,

ainda precisam ser elucidados. Neste sentido, o estudo eletrofisiológico pode fornecer informação suficiente à cerca da dinâmica entre diferentes estruturas neurais durante os processos de consolidação de memória.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar simultaneamente a dinâmica da atividade elétrica entre o córtex pré-frontal medial, hipocampo e córtex visual durante o condicionamento contextual de medo em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a contribuição dos ritmos delta e teta em função do estado comportamental (vigília exploratória e congelamento).
2. Verificar se a contribuição dessas bandas de frequência altera em função do tipo de memória evocada (recente ou remota) em animais submetidos a uma tarefa de medo condicionado ao contexto.
3. Verificar a direcionalidade (causalidade) das interações entre os ritmos delta e teta em função do estado comportamental (vigília exploratória e congelamento) e do tipo de memória evocada (recente ou remota).
4. Avaliar a dinâmica e a conectividade funcional entre o córtex pré-frontal, o hipocampo e o córtex visual durante a evocação das memórias recente e remota.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 24 Ratos Wistar machos provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pesando aproximadamente 300 gramas no início do experimento. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, no qual as luzes foram acesas às 7:00h. Água e comida foram oferecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq 0948/09) e pela Comissão de Ética no uso de animais do Hospital Sírio Libanês (CEUA 2008/04).

3.2 MATRIZ DE MICROELETRODOS

As matrizes de microeletrodos foram confeccionadas utilizando-se fios de tungstênio de 50 μm de diâmetro, isolados com uma camada de material inerte (Teflon), e impedância entre 1-3 $\text{M}\Omega$ mensurada a 1 kHz (Figura 5). Cada matriz é constituída por microeletrodos dispostos especificamente para as medidas necessárias ao implante no hipocampo dorsal, córtex cingulado anterior, área pré-límbica e córtex visual (Figura 6).

Figura 5: Etapas do processo de construção da matriz de microeletrodos. (A) Fio de tungstênio precisamente posicionado através das placas guia. (B) Fios fixados com cola epóxi. (C) Placa guia. (D) Placa de circuito impresso (PCB). (E) Conector (Omnetics, Minnesota, Estados Unidos) soldado ao PCB. (F) Fios conectados ao PCB. (G) Matriz de microeletrodos para implante na região CA1 do hipocampo. (H) Matriz de microeletrodos.

Figura 6: Arranjo das matrizes de microeletrodos. À esquerda (vista superior) observa-se a representação esquemática de cada matriz de eletrodos. (A) Foram implantados 18 eletrodos na região CA1 do hipocampo dispostos numa matriz de 3 X 6 com espaçamento entre os fios de 500 μm no eixo ântero-posterior (AP) e 400 μm no eixo médio-lateral (ML). (B) Quatro eletrodos no córtex pré-frontal, sendo dois eletrodos no córtex cingulado anterior e dois eletrodos no córtex pré-límbico dispostos numa matriz de 1 X 4 com espaçamento de 400 μm AP. (C) Nove eletrodos no córtex visual primário dispostos uma matriz de 3 X 3 com espaçamento de 400 μm em ambos os eixos, AP e ML. À direita observa-se a vista lateral de cada matriz de microeletrodos: (D) hipocampo, (E) córtex pré-frontal e (F) córtex visual primário.

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O rato foi pesado e anestesiado com cloridrato de cetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (4 mg/kg), após uma prévia indução anestésica com halotano a 5%. O nível anestésico foi mantido com doses suplementares de 20% da dose inicial de cloridrato de cetamina a cada hora ou sempre que o animal apresentou sensibilidade à dor. Após tricotomia e anti-sepsia do campo cirúrgico, o rato foi posicionado em um aparelho estereotáxico (*Kopf Instruments, Modelo 900*) e realizado uma incisão longitudinal da pele na linha média do crânio. Uma broca dental de alta rotação foi utilizada para realizar a craniotomia e a abertura de 3 orifícios onde foram inseridos microparafusos de aço inoxidável. Os microparafusos servem para fixar o implante no crânio com cola de cianoacrilato e como pontos de contato para o fio terra (Figura 7). Os microeletrodos foram implantados por técnica estereotáxica com o centro nas seguintes coordenadas ântero-posterior (AP), médio-lateral (ML) e dorso-ventral (DV) relativa ao bregma (em milímetros): região CA1 do hipocampo (AP: -3,60; ML: +2,60 e DV: -2,4), córtex cingulado anterior (AP: + 2,00; ML: +0,6 e DV: -1,80), córtex pré-límbico (AP: + 2,80; ML: +0,6 e DV: -3,40) e córtex visual (AP: -5,40; ML: +4,0 e DV: -1,60) (Figura 8) (Paxinos and Watson 1998).

Figura 7: Etapas da cirurgia de implante das matrizes de microeletrodos. (A) Incisão da pele. (B) Craniotomia. (C, D) Implante das matrizes de microeletrodos. (E) Animal conectado ao cabo de registro para registro agudo durante a cirurgia de implante. (F) Animal conectado ao cabo de registro uma semana após a cirurgia.

Figura 8: Representação esquemática dos sítios de implante das matrizes de microeletrodos. O centro da coordenada de implante está indicado com um círculo azul (PrL), preto (ACC), vermelho (CA1) e verde (V1). Adaptado de Paxinos e Watson (1998).

3.4 REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO

Uma semana após a cirurgia de implante foi iniciado o registro do potencial de campo local (*Local Field Potential – LFP*) usando-se um equipamento de aquisição (*Multichannel Acquisition Processor – Plexon Neurotechnology Research System*, Dallas, Texas, USA) e um software *RASPUTIN* (*Real-time Acquisition System Programs for Unit Timing in Neuroscience*, Plexon Neurotechnology Research System, Dallas, Texas, USA). Os sinais foram pré-amplificados (1000X), filtrados (0,3 a 400 Hz) e digitalizados a 2000 Hz por meio de uma placa (*National Instruments*, Austin,

Texas, USA) de 64 canais com uma frequência de aquisição de 40 kHz (ver figuras 9 e 10).

Figura 9: Registro multi-unitário de neurônios do hipocampo uma semana após a cirurgia de implante. (A) No canto superior à esquerda da figura observa-se o formato de onda de quatro neurônios (amarelo, verde, azul e vermelho). Cada neurônio é classificado em função da amplitude e do formato de onda. (B) Na parte superior, à direita da figura está ilustrada uma análise de componentes principais. (C) Ao lado o mesmo gráfico em 3D. (D) Na área inferior direita observa-se o registro do potencial de campo local (canais 22-31).

Figura 10: Registro unitário uma semana após a cirurgia de implante. (A) Neurônios do hipocampo. Cada neurônio é representado por uma cor diferente (amarelo, verde e azul) e classificado em função da amplitude e do formato de onda. (B) Neurônios do hipocampo (canais 1-18), córtex visual primário (canais 19-27), córtex cingulado anterior (canais 28 e 29) e córtex pré-límbico (canais 30 e 31). Os canais em preto (05, 06, 12, 14, 16, 29-32) não apresentam registros de neurônios.

3.5 APARATO DO EXPERIMENTO COMPORTAMENTAL

Os animais foram divididos em quatro grupos (A, B, C e D, seis ratos por grupo). Todos os grupos receberam implante de microeletrodos para registro da atividade elétrica cerebral e foram sacrificados após o término do experimento. Os animais dos grupos A e B foram sacrificados após o teste para a memória recente (1 dia após o treino) e os animais dos grupos C e D foram sacrificados após o teste para a memória remota (18 dias após o treino). Os animais dos grupos B e D realizaram todas as etapas do experimento (pré-exposição ao contexto, treino e teste), entretanto, não receberam o choque, e consistem em grupos controle do experimento eletrofisiológico.

Todos os animais foram treinados e testados numa tarefa de condicionamento contextual de medo (Frankland, Bontempi 2004). Para tanto foi utilizada uma caixa de condicionamento (26 x 21 x 27,5 cm; comprimento x largura x altura) que possui paredes pretas e tampa de acrílico transparente. A base é formada por grades metálicas (cada grade medindo 16,4 cm de diâmetro e equidistantes 1,2 cm uma da outra) conectadas a uma fonte geradora de choques elétricos em corrente alternada (AVS projetos especiais®). A caixa de condicionamento foi alocada dentro de uma gaiola de Faraday (89,5 X 79 X 54 cm³) e no teto superior desta há uma câmera de vídeo CCD com infravermelho para registrar o comportamento do animal durante a realização da tarefa (Ver figuras 11).

Figura 11: Sala de registro eletrofisiológico. (A) Caixa de condicionamento. (B) Sistema de registro eletrofisiológico. (C) Registro do comportamento do animal em vídeo. (D) Registro dos potenciais unitários e de campo local utilizando o Software RASPUTIN.

3.6 TREINAMENTO COMPORTAMENTAL

Os animais foram submetidos a sessões de habituação ao experimentador e ao ambiente, sendo este distinto do local de condicionamento, durante cinco minutos por dia ao longo de sete dias consecutivos. As sessões de treino e teste foram realizadas na fase clara do ciclo circadiano do animal e iniciadas sempre no mesmo horário (aproximadamente às 13 horas). No primeiro dia (pré-exposição ao

contexto), o animal foi colocado na caixa de condicionamento durante cinco minutos. No segundo dia (treino), o animal foi novamente colocado na caixa de condicionamento e após dois minutos foi aplicado um choque elétrico nas patas de intensidade 0,7 mA durante 2 segundos. Foram aplicados cinco choques com intervalo de um minuto entre os choques. O animal foi reintroduzido na caixa de condicionamento para análise do medo condicionado por meio do tempo de congelamento um dia (grupo D) ou dezoito dias (Grupo E) após a apresentação dos choques (Figura 12). O tempo de congelamento foi cronometrado pelo experimentador observando o comportamento do animal por meio de uma câmera de vídeo CCD .

Figura 12: Fluxograma esquemático do experimento. Antes do início do experimento comportamental os animais foram manipulados. Uma semana após, os ratos foram submetidos a uma cirurgia para implante das matrizes. Em seguida, os animais passam por um período de recuperação e terminado este período iniciou-se as sessões de registro eletrofisiológico. O experimento consiste em duas etapas: treino e teste. O treino é realizado em dois dias consecutivos. No primeiro dia (pré-exposição ao contexto) os animais foram introduzidos na caixa de condicionamento onde permaneceram por cinco minutos. Após 24 horas, os animais foram colocados na caixa e após 2 minutos receberam um choque elétrico nas patas durante 2 segundos. Os animais receberam 5 choques de 0,7 mA com intervalo de 1 minuto entre os choques. O teste de retenção foi realizado 1 ou 18 dias após o treino. O sacrifício dos animais foi realizado 90 minutos após o teste de retenção.

3.7 PERFUSÃO E HISTOLOGIA

A perfusão foi realizada através do ventrículo esquerdo com paraformaldeído tamponado 0,1M. Antes da abertura da cavidade torácica os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (350mg/kg) e cloridrato de xilazina (4 mg/kg). Após a perfusão, o cérebro foi removido e congelado a -80°C até posterior corte e coloração do tecido. Foi realizada a coloração de Nissl usando o corante cresil violeta para identificar a posição dos eletrodos.

3.8 ANÁLISES DE DADOS

3.8.1 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

A análise do comportamento foi realizada a partir da inspeção visual, quadro a quadro, do vídeo dos animais. O comportamento foi classificado em vigília exploratória ou congelamento. O animal foi considerado em vigília quando explorava o ambiente e apresentava intensa atividade locomotora. O congelamento foi considerado como a ausência total de movimentos exceto aqueles associados aos movimentos respiratórios (Kim and Fanselow 1992).

3.8.2 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA

Os dados eletrofisiológicos desta análise preliminar correspondem ao sinal registrado no hipocampo, córtex cingulado anterior, córtex pré-límbico e córtex visual primário dos animais treinados e testados para a memória recente (grupo A) ou remota (grupo C). Foram selecionados trechos do registro eletrofisiológico que correspondem a comportamentos específicos do animal (vigília exploratória ou congelamento).

Para cada eletrodo (por exemplo, o canal 1) foram selecionados 10 trechos ($r_{i,j}$) do sinal registrado no animal durante um determinado comportamento. Esse procedimento foi realizado para todos eletrodos implantados em um animal. Em seguida, este procedimento foi repetido para todos os animais dos grupos A e C. Cada trecho tem 2 segundos de duração visto que foram selecionados trechos com 4.000 pontos e o sinal foi registrado a uma frequência de amostragem de 2.000 Hz (Figura 13).

Depois de selecionados os trechos foi realizado uma análise espectral utilizando-se o estimador de Welch. A partir do gráfico do espectro de potências foram selecionadas as áreas que apresentavam a maior contribuição ao sinal. Cada área foi delimitada no eixo X por bandas de frequência (delta e teta, por exemplo). A contribuição de cada banda de frequência ao sinal foi calculada pela razão da energia das duas maiores potências no espectro. A razão entre os espectros ($r = \delta/\theta$ -razão) fornece a contribuição de uma banda de frequência em relação à outra (Figura 14).

Figura 13: Representação esquemática do sinal eletrofisiológico em 18 canais do hipocampo (canal 1 ao canal 18). Para cada canal foram selecionados 10 trechos ($r_{1,1}$ ao $r_{1,10}$). Este procedimento foi repetido para os 18 canais do hipocampo para um animal, e em seguida, para todos os animais dos grupos A e C .

Figura 14: Espectro de potência calculado pelo estimador de Welch. A razão entre os espectros ($r = \delta\theta$ -razão) fornece a contribuição da banda delta em relação a banda teta.

3.8.2.1 RAZÃO ENTRE ESPECTROS DE POTÊNCIA (δθ-razão)

Foi proposta uma medida denominada δθ-razão baseada na contribuição do espectro de potências do hipocampo. Esta medida é definida pela energia média dos ritmos delta (0,5 – 4 Hz) e teta (4 – 10 Hz), onde a energia média é definida pelo espectro de potência normalizado entre as duas frequências (Eq. 2).

O espectro de potência normalizado $\bar{E}_\omega$ de uma dada série temporal $f(t)$ em um determinado intervalo de frequências $\omega = [\nu_s, \nu_e]$ é definido por

$$\bar{E}_\omega = \frac{\int_{\nu_s}^{\nu_e} |\tilde{f}(\nu)|^2 d\nu}{\int_{\nu_s}^{\nu_e} d\nu}, \quad (\text{Eq. 1})$$

onde $\tilde{f}(\nu)$ é a transformada de Fourier de $f(t)$. Desta forma, pode-se definir a δθ-razão como δθ-razão = $\bar{E}_\delta / \bar{E}_\theta$. (Eq. 2).

A transformada de wavelet de uma determinada onda cerebral $f(t)$ localizado em τ com escala ℓ , é dado pela função de convolução $f(t)$ com a wavelet $\psi_\tau(t, \ell)$,

$$W_\tau(\ell) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \psi_\tau^*(t, \ell) dt, \quad (\text{Eq. 3})$$

onde a função kernel é definida como

$$\psi_\tau(t, \ell) = \frac{1}{\sqrt{\ell}} \psi\left(\frac{t - \tau}{\ell}\right), \quad (\text{Eq. 4})$$

e $\psi(t)$ é a wavelet mãe, para o qual utilizou-se a função de Morlet (Goupillaud, Grossman 1984)

$$\psi(t) = \pi^{-1/4} \exp(-6it) \exp(-t^2/2) . \quad (\text{Eq. 5})$$

Desta forma, a relação tempo-escala é determinada pela

$$\ell = \frac{\ell_c}{v\Delta t} , \quad (\text{Eq. 6})$$

onde Δt é o período de amostragem e $\ell_c \approx 0.938$ é a escala central da wavelet. A reconstrução parcial da wavelet (Torrence and Compo 1998) é definida como

$$f_\omega(t) = \frac{r(\ell_\omega)\sqrt{\Delta t}}{\pi^{-1/4}\eta} \sum_{j, v_j \in \omega} \frac{\Re[W_\tau(\ell)]}{\sqrt{\ell_j}} , \quad (\text{Eq. 7})$$

com $\eta = 0.776$. O parâmetro de reconstrução da onda $r(\ell_\omega)$ é definido como o declive do gráfico $(s - e)$ vs. $\log_2(\ell_s/\ell_e)$. A Fig. 15 ilustra a decomposição do registro do potencial de campo local para a vigília exploratória (Fig. 15A) e o congelamento (Fig. S1D). As series temporais delta (Fig. 15, B e E) e teta (Fig. 15, C e F) foram parcialmente reconstruídas e aplicadas no método de causalidade descrito abaixo.

Figura 15: Decomposição do registro do potencial de campo local nas bandas delta e teta no domínio do tempo. (A) Sinal registrado durante o comportamento de vigília exploratória e os respectivos sinais decompostos na (B) banda delta e (C) na banda teta. (D) Sinal registrado durante o comportamento de congelamento e os respectivos sinais decompostos na banda delta (E) e teta (F).

3.8.2.2 CAUSALIDADE

Outra medida estudada foi a relação de causalidade entre ritmos cerebrais. Os métodos usados nesta medida foi descrito por Le Quyen *et al.* (1999). Considerando a reconstrução do espaço de fase de Taken $X_i = (x_i, x_{i-1})$ and $Y_i = (y_i, y_{i-1})$, onde x_i e y_i são observações das duas séries temporais, para $i = 1, 2, \dots, N$. A predição cruzada de y dado x é

$$\hat{y}_{i+1} = \frac{1}{|\mathcal{U}_\varepsilon(X_i)|_\#} \sum_{j, X_j \in \mathcal{U}_\varepsilon(X_i)} y_{j+1}, \quad (\text{Eq. 10})$$

e $\mathcal{U}_\varepsilon(X_i) = \{X_j : \|X_i - X_j\| < \varepsilon\}$ são os vizinhos de X_i de raio ε e $|\mathcal{U}_\varepsilon(X_i)|_\#$ denota o número de elementos daquela vizinhança. Desta forma, a função de previsibilidade cruzada é definida como

$$\pi_{x \rightarrow y} = 1 - \sqrt{\frac{\sum_{i=2}^N (\hat{y}_i - y_i)^2}{N-1}}. \quad (\text{Eq. 11})$$

Assim, a significância da causalidade não-linear é definida pela

$$\pi'_{x \rightarrow y} = \frac{\pi_{x \rightarrow y} - \langle \pi_{x \rightarrow y}^{\text{surr}} \rangle}{\sigma(\pi_{x \rightarrow y}^{\text{surr}})}. \quad (\text{Eq. 12})$$

“surr” é a media de surrogates das séries temporais geradas pela permutação randômica das y observações. Como um exemplo, considere o seguinte sistema acoplado

$$\dot{x}_1 = -6(x_2 + x_3), \quad \dot{x}_2 = 6(x_1 + 0.2x_2), \quad \dot{x}_3 = 6(0.2 + x_3(x_1 - 5.7)), \quad (\text{Eq. S13a})$$

$$\dot{y}_1 = 10(y_2 - y_1) , \dot{y}_2 = 28y_1 - y_2 - y_1y_3 + \beta x_2^2, \dot{y}_3 = y_1y_2 - 8/3y_3 , \quad (\text{Eq. S13b})$$

onde β é a força do acoplamento unidirecional. As figuras 16C and 16E ilustra as projeções no plano $(y_1, \tilde{y}_1)$ para dois valores distintos de intensidade do acoplamento, a solução y_1 tem uma diferente condição inicial daquela usada para $\tilde{y}_1$ em simulações numéricas. A respectiva reconstrução do espaço de fase foram apresentadas nas figuras 16B and 16D. A figura 16F traz o $\pi_{x \rightarrow y}$ e $\pi_{y \rightarrow x}$ como uma função de parâmetro de acoplamento β .

Figura 16: Método de causalidade em um sistema resposta orientado. (A) Reconstrução do espaço de fase de um sistema orientado, definido na Eq. 13a, e (B) para o sistema resposta Y, definido na Eq. 13b, numericamente envolvido com o parâmetro de acoplamento $\beta = 0$. (C) Projeção sobre o plano $(y_1(t), \tilde{y}_1(t))$, com $y_1(0) \neq \tilde{y}_1(0)$. (D) O atrator acoplado reconstruído e (E) a respectiva projeção $(y_1(t), \tilde{y}_1(t))$. A diagonal $y_1(t) = \tilde{y}_1(t)$ indica que o sistema resposta orientado é funcionalmente relacionado. (F) Valores de predição cruzada em função do parâmetro β .

3.8.2.3 SINCRONIZAÇÃO DE FASE

Neste trabalho, utilizou-se o conceito de sincronização por fase (Pikovsky, Rosenblum 2001) para determinar as propriedades de algumas regiões do cérebro envolvidas nos processos de memória. Primeiro foi necessário identificar uma fase do sistema a partir do qual foram obtidas as séries temporais deste experimento. Esta medida é definida como

$\phi_\tau(\ell) = \Im[W_\tau(\ell)]/\Re[W_\tau(\ell)]$. Desta forma, foi proposta uma medida da fase media ponderada pela energia calculada sobre todas as escalas da wavelet,

$$\phi_\tau = \frac{1}{\Gamma_\tau} \sum_{\ell} \frac{|W_\tau(\ell)|^2}{\ell^2} \phi_\tau(\ell) , \quad (\text{Eq. 8})$$

onde $\Gamma_\tau = \sum_{\ell} |W_\tau(\ell)|^2 / \ell^2$. Foi utilizada uma medida, denominada *phase-locking value* (PLV), para avaliar a consistência da diferença de fase, sendo zero para estados não sincronizados e um para uma completa sincronização (Sakaguchi, Shinomoto 1987). Esta medida é definida como

$$\text{PLV} = \frac{1}{N} \left| \sum_{\tau=1}^T \exp(i\Delta\phi_\tau) \right| , \quad (\text{Eq. 9})$$

com $\Delta\phi_\tau = \phi_\tau^a - \phi_\tau^b$, e a e b correspondendo a diferentes áreas do cérebro estudadas.

3.8.3 ANÁLISE ESTADÍSTICA

Foram realizados testes estatísticos paramétricos usando o teste t de Student pareado e o não-pareado. Nos casos não paramétricos foi aplicado o teste W de Wilcoxon para comparações pareadas e o teste U de *Mann-Whitney* para amostras não-pareadas. A hipótese de normalidade foi verificada usando o Lilliefors teste. O nível de significância adotado em todas as análises deste trabalho foi 5%. Os resultados apresentados são expressos em termos da média e desvio padrão em porcentagem.

4.0 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Uma análise estatística do tempo de congelamento médio dos grupos mostrou que os animais treinados, grupos A (memória recente) e C (memória remota), apresentaram uma taxa de congelamento de $75,30 \pm 9,27\%$ e $60,83 \pm 6,21\%$, respectivamente. Os animais dos grupos controle, B (memória recente) e D (memória remota), apresentaram níveis de congelamento em torno de $10,67 \pm 2,66\%$ e $11,50 \pm 3,50\%$, respectivamente (Figura 17 A).

O teste t de Student revelou que existe diferença significativa na taxa de congelamento entre os grupos treinados em relação à memória recente e remota $p < 0.01$ (teste t não pareado). Em média, os níveis de congelamento dos animais testados para a memória recente foi maior em relação à memória remota. Os grupos controle não apresentaram diferença significativa entre si para ambos os tipos de memória testada.

Figura 17: Taxa de congelamento médio dos grupos. (A) Grupo treinado e controle durante o teste de retenção para as memórias recente e remota. ** Em média $p < 0.01$ (teste t não pareado). (B) Medida $\delta\theta$ -razão durante a vigília exploratória e o congelamento. Esta medida difere entre os grupos F01 e F18 ($p < 0.001$, teste t não pareado). Também foi observada diferença significativa entre os estados comportamentais, AE e F ($p < 0.001$, teste t pareado), para os grupos testados para a memória recente e remota. Não foi observada diferença entre os grupos AE01 e AE18 ($p = 0.161$, teste t não pareado). Registro do potencial de campo local da região CA1 do hipocampo durante os estados comportamentais: (C) vigília exploratória e congelamento durante os testes para a memória (D) recente e (E) remota.

4.1 ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA

A medida $\delta\theta$ -razão foi utilizada para caracterizar os animais em congelamento testados para a memória recente (F01) e remota (F18). Verificou-se que esta medida apresentou um proeminente aumento em F01 ($6,473 \pm 15,8\%$) e um decréscimo em F18 ($3,080 \pm 28,5\%$). Esta diferença pode estar relacionada ao tempo de congelamento que foi significativamente diferente em ambos os grupos como mostrado na Figura 17A. Esta medida também mostrou ser eficiente para distinguir os estados comportamentais, em conformidade com as características observadas nos espectros de potência dos animais em vigília exploratória e congelamento (ver exemplo nas figuras 18A e B). Valores médios da $\delta\theta$ -razão para os animais em vigília exploratória do grupo testado para memória recente ($0,301 \pm 20,4\%$; AE01) e remota ($0,308 \pm 29,7\%$; AE18). A figura 17B sumariza todos os resultados da medida $\delta\theta$ -razão.

Dado que as contribuições de energia das oscilações delta e teta variaram simultaneamente com o estado comportamental, decidiu-se investigar a relação causal entre as oscilações delta e teta que gera as mudanças relacionadas a dinâmica da $\delta\theta$ -razão. Foi aplicada a transformada de wavelet para o sinal do LFP decomposto e reconstruído parcialmente as séries temporais delta e teta em suas respectivas bandas de frequência (ver Eq. 7). Esta técnica é bastante adequada porque preserva as características espectrais obtidas a partir do espectro de potências (Figura 18).

Figura 18: Padrões espectrais das séries temporais registradas no hipocampo durante a vigília exploratória e o congelamento. Espectro de potência obtido a partir de um segmento de 2 segundos durante os comportamentos de (A) vigília exploratória e (B) congelamento. A medida $\delta\theta$ -razão para estes exemplos são respectivamente 0,415 and 3,748. Escalograma (wavelet) usado para as respectivas séries temporais durante a (C) vigília exploratória e o (D) congelamento.

Para inferir a direcionalidade da interação entre os ritmos delta e teta foi utilizado o método de causalidade proposto por Le Van Quyen *et al.* (1999). A influência causal do ritmo delta para o ritmo teta, representado por $\pi_{\delta \rightarrow \theta}$ para os grupos F01 ($0,098 \pm 12,2\%$) e F18 ($0,088 \pm 25,2\%$) foi estatisticamente similar ($p = 0,348$; teste t não pareado). Esta medida também não muda quando comparado AE01 ($0,088 \pm 26,9\%$) com F01 ($p = 0,502$; teste t pareado) e AE18 ($0,097 \pm 25\%$) com F18 ($p = 0,494$; teste t pareado). Da mesma forma, a medida $\pi_{\delta \rightarrow \theta}$ não mostrou diferença significativa entre os grupos AE01 e AE18 ($p = 0,937$; teste U não pareado).

Por outro lado, a direcionalidade do ritmo teta para o ritmo delta, representado por $\pi_{\theta \rightarrow \delta}$, foi capaz de distinguir os estados comportamentais nos grupos testados para a memória recente (AE01 $0,029 \pm 27,6\%$; F01 $0,055 \pm 11,8\%$; $p < 0,005$, teste t pareado) e remota (AE18 $0,031 \pm 26,1\%$; F18 $0,065 \pm 14,5\%$; $p < 0,05$; teste W pareado). A causalidade $\pi_{\theta \rightarrow \delta}$ não mostrou diferença significativa entre os grupos AE01 e AE18 ($p = 0,737$; teste t não pareado), como também para os grupos F01 e F18 ($p = 0,073$; teste t não pareado). Portanto, a influência do ritmo teta sobre o ritmo delta é útil para distinguir variações nos estados comportamentais, porém não o tipo de memória evocada, recente ou remota. Portanto, é possível que a influência do ritmo teta sobre o ritmo delta gere as variações observadas na medida $\delta\theta$ -razão entre os diferentes estados comportamentais. Um motivo para não ter sido verificado diferença significativa nas relações de causalidade entre os ritmos cerebrais em função do tipo de memória é porque os animais em congelamento testados para a memória recente e

remota apresentaram padrões espectrais semelhantes em relação as contribuições dos ritmos delta e teta.

Baseado nestes resultados foi proposto que o aumento da causalidade está relacionado com a iniciativa que um ritmo tem de se aproximar do outro. Para testar esta hipótese, foi selecionado para cada ritmo, delta e teta, a frequência que apresentou a maior energia no espectro de potências. Ou seja, o pico da frequência (em hertz) para cada ritmo. Para o ritmo teta, comparando AE01 (6,818 Hz $\pm$ 5,9%) com F01 (5,381 Hz $\pm$ 6,6%) e AE18 (6,819 $\pm$ 6%) com F18 (5,412 $\pm$ 10,6%) observa-se diferença significativa entre os grupos (recente $p < 0,005$; remota $p < 0,001$; teste t pareado para ambos os casos). Não foi observada diferença entre os grupos AE01 e AE18 ($p = 0,937$, teste U não pareado) e os grupos F01 e F18 ($p = 0,915$, teste t não pareado).

Esta medida de frequência para o ritmo delta no grupo F01 (1,977 Hz $\pm$ 15,6%) quando comparado com o grupo AE01 (2,931 Hz $\pm$ 8%) é menor ($p < 0,001$, teste t pareado unilateral) e para os grupos F18 (2,625 $\pm$ 14,4%) e AE18 (2,925 $\pm$ 15,9%) é menor ($p = 0,377$, teste t pareado), sem que o deslocamento da frequência delta ocorra em direção à frequência teta. Acredita-se que a diminuição no pico da frequência teta durante o congelamento (≈ 5 Hz) em relação à vigília exploratória (≈ 7 Hz) é característico comportamental do animal. Seidenbecher *et al.* (2003), mostrou a ocorrência de uma forte sincronização em torno de 5 Hz entre a amígdala e o hipocampo durante o congelamento em camundongos treinados numa tarefa de medo condicionado.

Os resultados apresentados se referem ao estudo da relação entre os ritmos delta e teta hipocampal. É possível que estes ritmos estejam dinamicamente relacionados para facilitar a comunicação entre o hipocampo e o córtex cerebral. Para investigar as interações do hipocampo com outras áreas do cérebro durante a evocação das memórias aversivas, foi proposto um método de análise de sincronia de fase. Tem sido proposto que a sincronização de fase é uma medida relacionada à comunicação neuronal e a plasticidade sináptica entre diferentes regiões do cérebro (Fell and Axmacher 2011). A estabilidade da diferença de fase entre duas séries temporais determina o nível de sincronia caracterizado pelo *phase-locking value* (PLV) definido na Eq. S9. As áreas corticais consideradas neste estudo foram o córtex cingulado anterior (ACC), pré-límbico (PrL) e visual primário (V1). Inúmeros estudos têm investigado estas áreas devido ao seu papel no armazenamento das memórias de longa duração (Frankland, Bontempi 2004; Squire and Alvarez 1995; McClelland, McNaughton 1995; Takehara, Kawahara 2003; Restivo, Vetere 2009).

O PLV entre CA1-ACC foi elevado em F01 ($0,540 \pm 9,6\%$), decrescendo em F18 ($0,257 \pm 27,6\%$). O mesmo padrão temporal foi observado entre CA1-PrL (recente $0,545 \pm 10\%$; remota $0,276 \pm 40,1\%$). A sincronização observada entre os pares CA1-PrL e CA1-ACC durante a evocação das memórias recentemente adquiridas pode ser interpretado como uma comunicação necessária para o estabelecimento das memórias no neocortex. Uma vez que estas memórias estão estabelecidas no córtex, a

comunicação entre as áreas diminui e isto se reflete numa diminuição da sincronia (ver Fig. 19).

O acoplamento entre CA1-V1 não muda quando comparado F01 e F18 ($0,640 \pm 2,4\%$). Outros autores têm mostrado que V1 não está envolvido na evocação das memórias de medo condicionado (Frankland, Bontempi 2004; Restivo, Vetere 2009). A sincronização entre as regiões corticais, V1-ACC (recente $0,399 \pm 14,2\%$; remota $0,344 \pm 28,7\%$) e V1-PrL (recente $0,409 \pm 8,5\%$; remota $0,384 \pm 29,9\%$) também não varia (Fig. 19A). Desta forma, parece razoável pensar que o hipocampo é o responsável pela diminuição da sincronia durante a evocação da memória remota de medo.

Nossos resultados corroboram com a hipótese de que o hipocampo gradualmente distribui a informação para áreas neocorticais (Takehara, Kawahara 2003; Frankland and Bontempi 2005). Observou-se que existe algum nível de sincronização entre o hipocampo e as áreas corticais estudadas, embora em menor proporção durante a evocação das memórias remotas. A diminuição do envolvimento do hipocampo no teste de evocação das memórias remotas foi anteriormente observado por meio de técnicas imunohistoquímicas que avaliaram a expressão de genes imediatos relacionados ao aprendizado e memória (Frankland, Bontempi 2004), bem como por meio da mensuração da densidade de espinhos dendríticos (Restivo, Vetere 2009). A figura 19B resume os resultados de sincronização de fase descritos.

Figura 19: Sincronização de fase no sistema cortico-hipocampal durante a evocação das memórias aversivas. (A) Os PLVs obtidos para os pares CA1-ACC e CA1-PrL sincronizaram mais efetivamente no grupo F01 quando comparado com o grupo F18. Média $p < 0,001$ (teste t não pareado). A sincronização entre CA1 e V1 não mudou com respeito ao tipo de memória evocada ($p = 0,709$, teste t não pareado). Os pares de sincronização córtico-hipocampal também não mudaram ($p = 0,310$ para V1-ACC; $p = 0,622$ para V1-PrL, ambos teste t não pareado). (B) Gráfico esquemático resumindo a relação do hipocampo com as áreas corticais e o respectivo sinal de fase (1,5 segundos de duração). No teste de memória recente, o hipocampo e o córtex apresentam uma sincronização mais eficiente (linha preta para PLV médio acima de 0,5, e cinza entre 0,3 e 0,5). Durante o teste para a memória remota, a sincronização do hipocampo com o ACC e o PrL diminuiu quando comparado com o teste para a memória recente (linha cinza tracejada para PLV médio abaixo de 0,3), enquanto as sincronizações córtico-cortical e CA1-V1 mantém o mesmo nível de sincronização.

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Todos os animais foram perfundidos e o cérebro foi congelado. Na figura 20 observa-se a matriz de eletrodos fixa ao crânio (A) e o cérebro após a perfusão e a remoção do implante (B). Há pouca gliose em volta do eletrodo e a lesão cortical devido a penetração dos eletrodos no tecido é mínima. Na figura 21A observa-se um corte histológico do hipocampo. É possível visualizar o rastro dos eletrodos imediatamente acima da camada piramidal de CA1. Ao lado (Figura 21B) observa-se uma secção do córtex cingulado anterior marcado para o anticorpo *fos*.

Figura 20: (A) Matriz de eletrodos fixa ao crânio após a remoção do cérebro. (B) Cérebro do animal após a perfusão e remoção do implante.

Figura 21: (A) Secção coronal através do hipocampo corado com uma coloração de Nissl (B) e do córtex cingulado anterior marcado para o anticorpo *fos*. As setas indicam a região onde foi implantada a matriz de microeletrodos. Escala de barra = 500 μm. Objetiva 2.5 X

5. DISCUSSÃO

Está bem estabelecido que diferentes estados comportamentais apresentam padrões espectrais característicos. Na vigília exploratória verificou-se uma maior contribuição no espectro do ritmo teta, enquanto durante o congelamento, constatou-se uma maior contribuição do ritmo delta. Houve um rebalanceamento entre os ritmos delta e teta em função do estado comportamental do animal.

Para realçar essas diferenças entre os ritmos foi definida uma medida denominada $\delta\theta$ -razão. Esta medida, obtida a partir do sinal registrado no hipocampo, foi capaz de caracterizar os diferentes estados comportamentais (vigília exploratória ou congelamento) em todos os grupos. Por último, verificamos que nos animais em congelamento esta medida é maior no grupo testado para a memória recente em relação ao grupo testado para a memória remota. Portanto, esta medida além de caracterizar os estados comportamentais foi capaz de distinguir o tipo de memória evocada, se recente ou remota.

Visto que existe um rebalanceamento entre os ritmos delta e teta em função do estado comportamental do animal, qual ritmo contribui mais para esta dinâmica? Existe alguma relação de causalidade entre os ritmos? Verificamos que o ritmo teta contribuiu mais para esta dinâmica durante a vigília exploratória. Está bem estabelecido na literatura que durante a vigília exploratória a atividade elétrica cerebral predominante no hipocampo é o ritmo teta (Vanderwolf 1969; Gavrilov, Wiener 1995; Slawinska and Kasicki 1998). Nossos resultados corroboram com esses achados e acrescenta que durante a reação de congelamento, houve um significativo aumento do ritmo

delta em relação ao teta hipocampal. Resultado similar foi encontrado por (Mandile, Giuditta 2003) em ratos treinados e testados numa tarefa de esquiva inibitória. Os resultados reportados por Mandile *et al.* (2003) mostram que o ritmo delta está positivamente correlacionado com a taxa de congelamento e inversamente correlacionado com esquivas. Por outro lado, o ritmo teta está positivamente correlacionado com esquivas e inversamente correlacionado com a reação de congelamento.

Um modelo para explicar a dinâmica cerebral oscilatória foi proposto por Lakatos, Shan *et al.* (2005). Estes pesquisadores sugerem que existe uma organização hierárquica no sinal do EEG, no qual a amplitude de cada frequência oscilatória é modulada pela fase de uma oscilação de baixa. Desta forma, a amplitude da onda gama é modulada pela fase do teta, e a amplitude do teta é modulada pela fase do delta. Lakatos, Szilágyi *et al.* (2004) mostraram que a fase dessas atividades oscilatórias controlam a excitabilidade de populações neuronais corticais e desta forma podem influenciar o processamento de estímulos sensoriais. Segundo os autores, para cada banda de oscilação, existe uma fase ideal, durante a qual a resposta ao estímulo é aumentada. Se estas oscilações não ocorrem em fase a resposta ao estímulo pode ser inibida.

Esta organização hierárquica da atividade elétrica cerebral foi descrita em seres humanos, gatos e ratos (Lakatos, Szilágyi 2004; Amzica and Steriade 1998; Freeman and Rogers 2002; Steriade, Contreras 1996; Vanhatalo, Palva 2004). Entretanto, a dependência da amplitude da oscilação gama sobre a fase do teta foi bem caracterizada apenas no

hipocampo (Bragin, Jando 1995; Buzsáki, Buhla 2003; Csicsvari, Jamieson 2003) e no córtex entorrinal (Chrobak and Buzsáki 1998; Cunningham, Davies 2003). Desta forma, ainda são necessários mais estudos a cerca da dinâmica de interação entre os ritmos cerebrais visto que esta pode ser um importante mecanismo capaz de favorecer os processos de memória. Até o momento, estudamos a relação de causalidade entre os ritmos delta e teta. Mostramos que o ritmo teta causa as alterações relacionadas ao delta e que isso varia em função do estado comportamental do animal. Neste sentido, as análises que propomos neste trabalho ajudam a esclarecer os mecanismos envolvidos na dinâmica entre os ritmos cerebrais. Porém, estender esta análise ao estudo de outros ritmos cerebrais como o ritmo gama pode trazer novos e interessantes resultados.

Além de investigar a influência de um ritmo cerebral sobre o outro, estudamos a dinâmica de interação entre o hipocampo e as áreas do córtex pré-frontal medial. O hipocampo tem um importante papel na aquisição das memórias. Entretanto, essas memórias não ficam armazenadas permanentemente no hipocampo. Uma hipótese é que essas memórias são progressivamente transferidas para áreas do córtex pré-frontal medial.

Portanto, se o hipocampo transfere as informações para áreas corticais, uma pergunta natural seria quais os mecanismos envolvidos nesta dinâmica? Para responder a esta questão estudamos a distribuição de fase entre o hipocampo e o córtex pré-frontal medial. Observou-se uma maior sincronia entre o hipocampo e o córtex durante a evocação das memórias recente quando comparado as memórias remota. Acreditamos que isso pode

estar refletindo uma diminuição de comunicação entre o hipocampo e o córtex.

Frankland, Bontempi *et al.* (2004) relataram que os genes imediatos *Zif-268* e *Fos* são intensamente ativados no hipocampo após a evocação da memória recente, mas não da memória remota. O contrário foi observado em áreas do córtex pré-frontal medial como o córtex cingulado anterior, o córtex pré-límbico e o córtex infra-límbico. Nestas regiões foi observado um aumento significativo na expressão desses genes após a evocação da memória remota, mas não da memória recente. Estes resultados indicam que a evocação de diferentes tipos de memória é mediada por mecanismos distintos em diferentes regiões do cérebro.

Mais recentemente, Restivo, Vetere *et al.* (2009), em concordância aos achados de Frankland, Bontempi *et al.* (2004), mostraram que o crescimento de espinhos dendríticos está relacionado a evocação da memória recente no hipocampo e a memória remota no córtex cingulado anterior durante uma tarefa de condicionamento de medo ao contexto.

Estudos eletrofisiológicos também indicam o envolvimento de diferentes estruturas neurais em diferentes estágios dos processos de consolidação da memória. Narayanan, Seidenbecher *et al.*, (2007) relataram um aumento da sincronização na fase teta entre a amígdala e o hipocampo durante a evocação da memória 24 horas após o treinamento numa tarefa de medo condicionado. Este resultado não foi observado para a memória evocada 2, 30, 120 minutos ou 30 dias após o treino. Estes resultados

reforçam a hipótese que as memórias recentes e remotas são processadas por distintos mecanismos neurais.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostram que os ritmos teta e delta desempenham um importante papel nas respostas comportamentais e na evocação da memória aversiva. Eles contribuem para a evocação do medo e sua contribuição depende do tipo de memória evocada, recente ou remota. Além disso, mostramos que a contribuição do ritmo teta é fortemente pronunciada na vigília exploratória, diminuindo durante a reação de congelamento. Neste último caso, os ratos apresentaram um aumento na contribuição do ritmo delta. Além disso, a medida de causalidade mostrou uma maior influência do ritmo teta sobre o ritmo delta em função do estado comportamental do animal. Finalmente, nós mostramos um aumento de sincronia entre o hipocampo e o córtex pré-frontal durante a evocação da memória recente, mas uma diminuição na memória remota. Propusemos que a atividade sincronizada pode facilitar a comunicação entre as áreas. Uma vez que as memórias são estabelecidas no neocórtex a comunicação com o hipocampo diminui e isso reflete-se numa diminuição da sincronização no sistema córtico-hipocampal.

7. ANEXOS

7.1 TRANSFORMADA DE FOURIER

A transformada de Fourier fornece informações a respeito da contribuição de cada harmônico à dinâmica global, verificando a existência de frequências dominantes na evolução do sistema. Escreve-se a transformada de Fourier contínua de uma função f como

$$\tilde{f}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \exp(-i2\pi\omega t) dt, \quad (\text{Eq. 1})$$

indicando o peso relativo com que a frequência ω comparece na composição de f . Descrevendo de uma maneira muito simples e incompleta, as condições necessárias que a função f deve satisfazer para a existência de uma representação de Fourier são a integrabilidade no intervalo $(-\infty, \infty)$ e a continuidade aos pedaços em cada intervalo finito. Esta última asserção também inclui o fato de que nas condições assintóticas $t \rightarrow \pm\infty$, f deve decair a zero mais rápido que qualquer potência de t , pois as integrais envolvidas são integrais impróprias. Tecnicamente, o conjunto de funções que decrescem, juntamente com suas derivadas, de maneira suficientemente rápida tal que as integrais existam é chamada de classe de funções de Schwartz. Este conjunto é fechado sob a transformação de Fourier.

Com o auxílio do teorema de Parseval, é possível calcular a quantidade de energia contida em f como função da frequência ω , definida como:

$$s(\omega) \propto |\tilde{f}(\omega)|^2, \quad (\text{Eq. 2})$$

onde $s(\omega)$ é uma função real e não negativa de ω . A relação acima é chamada de espectro de potências e indica que uma dada distribuição de densidade espectral está associada com uma determinada quantidade particular de energia a cada frequência do espectro.

Em casos de interesse prático, dispõe-se de uma série finita e discreta $f_j \equiv f(t_j)$, para $t_j = j\delta t$ com $j = 0, 1, \dots, N-1$. Desse modo, a transformada de Fourier discreta de f_j é definida por outra série $f_\kappa \equiv \tilde{f}(\omega_\kappa)$, onde $\omega_\kappa = \kappa/(N\delta t)$, determinada por:

$$\tilde{f}_\kappa = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{j=0}^{N-1} f_j \exp\left(\frac{-i2\pi j\kappa}{N}\right), \quad \kappa = 0, 1, \dots, N-1 \quad (\text{Eq. 3})$$

Desta expansão, com o auxílio da relação de ortogonalidade discreta para as exponenciais complexas periódicas,

$$\sum_{\kappa=0}^{N-1} \exp\left[i2\pi\kappa\left(\frac{j-n}{N}\right)\right] = N\delta_{j-n,m}, \quad m = 0, \pm N, \pm 2N, \dots, \quad (\text{Eq. 4})$$

obtém-se a transformação inversa

$$\begin{aligned} \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{\kappa=0}^{N-1} \tilde{f}_\kappa \exp\left(\frac{i2\pi j\kappa}{N}\right) &= \frac{1}{N} \sum_{\kappa=0}^{N-1} \sum_{n=0}^{N-1} f_n \exp\left(\frac{-i2\pi n\kappa}{N}\right) \exp\left(\frac{i2\pi j\kappa}{N}\right), \\ &= \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} f_n \left\{ \sum_{\kappa=0}^{N-1} \exp\left[i2\pi\kappa\left(\frac{j-n}{N}\right)\right] \right\} = \sum_{n=0}^{N-1} f_n \delta_{jn} = f_j, \quad (\text{Eq. 5}) \end{aligned}$$

onde o uso de somatórios nas Eqs. (3) e (5) pressupõe $f_{j+N} = f_j$ e, consequentemente, $\tilde{f}_{\kappa+N} = \tilde{f}_\kappa$. Neste caso, mantém-se uma correspondência biunívoca entre o par de transformadas discretas.

7.2 PERIODOGRAMA DE BARTLETT

No método proposto por Bartlett divide-se efetivamente o intervalo N em K intervalos com L amostras, ou seja, $N = LK$. Assim, o sinal $X(n)$ no intervalo K é dado por:

$$X^{(*)}(n) = X(KL + \eta) \quad (Eq. 1)$$

Deste modo, um estimador do periodograma no intervalo K é escrito como:

$$\hat{P}_{xx}(\omega, \kappa) = \frac{1}{L} \left| \sum_{\eta=0}^{L-1} x^{\kappa}(\eta) e^{-i\omega\eta} \right|^2, \quad (Eq. 2)$$

e finalmente, o estimador de Bartlett escreve-se como a média das K periodogramas, ou seja,

$$\hat{P}_{xx}^{BT}(\omega) = \frac{1}{K} \left| \sum_{\kappa=0}^{K-1} P_{xx}(\hat{\omega}, \kappa) \right| \quad (Eq. 3)$$

Demonstra-se facilmente que o estimador de Bartlett tem o mesmo viés que o periodograma, mas a sua variância diminui proporcionalmente com o número de intervalos, ou seja, a estabilidade do estimador aumenta proporcionalmente com K . A única desvantagem do método é a perda de resolução devido à diminuição do intervalo de observação de N para L . Desta forma, foram desenvolvidos vários métodos que buscam equilibrar a relação entre a estabilidade e resolução.

7.3 PERIODOGRAMA DE WELCH

O periodograma de Welch tem características semelhantes ao periodograma de Bartlett. A diferença é que esta técnica utiliza as janelas temporais com a sobreposição dos K intervalos de estimação dos espectros. Seja uma série $X(n)$ ($n = 0, 1, \dots, N - 1$) dividida em K segmentos com L amostras cada, onde cada segmento está atrasado em relação ao anterior de $S \leq L$ amostras. Então, o número de segmentos K é igual à parte inteira de $(N - L)/S + 1$.

O periodograma de Welch permite, para um mesmo valor de N , uma maior estabilidade porque K é mais elevado mantendo uma resolução constante. Além disso, é possível provar que uma sobreposição de 50% oferece a melhor relação estabilidade/resolução para valores de N e L fixos.

7.4 PREVISIBILIDADE CRUZADA NÃO LINEAR (CAUSALIDADE)

Introduzido por Lorenz (1969) e originalmente construído como um teste de estacionariedade para séries temporais caóticas, este esquema será aqui adaptado para o estudo de causalidade em sistemas multivariados não lineares. Considerando-se duas séries temporais x_j e y_j , para $j = 1, 2, \dots, n$, e seus respectivos vetores reconstruídos $\vec{x}_j$ e $\vec{y}_j$. Define-se a medida de previsibilidade como

$$\pi_{y \leftarrow x}(d_\mu) = 1 - \left[\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^{n-1} (\hat{y}_{j+1} - y_{j+1})^{d_\mu} \right]^{1/d_\mu}, \quad (Eq. 1)$$

onde o estimador é determinado por

$$\hat{y}_{j+1} = \frac{1}{|\mathcal{U}_\varepsilon(\vec{x}_j)|} \sum_{\kappa} y_{\kappa+1}, \text{ tal que } \kappa : \vec{x}_\kappa \in \mathcal{U}_\varepsilon(\vec{x}_j), \quad (Eq. 2)$$

para $\mathcal{U}_\varepsilon(\vec{x}_j) = \{\vec{x}_i : \|\vec{x}_j - \vec{x}_i\| < \varepsilon\}$ definida como uma ε -vizinhança de $\vec{x}_j$ e o parâmetro d_μ associado a norma usada no cálculo da distância $\|\cdot\|$. O termo $|\mathcal{U}_\varepsilon(\vec{x}_j)|$ denota o número de elementos na vizinhança.

Este esquema de predição tem uma vantagem com relação a outros métodos não lineares, pois estimadores com a estrutura do descrito pela Eq. (2) apresentam resultados estáveis, mesmo para séries com um número reduzido de dados. Como exemplos ilustram-se dois sistemas contínuos unidirecionalmente acoplados definidos por

$$\text{Rössler (ativo), } \vec{x} \equiv F_\gamma(\vec{x}) : \begin{cases} \dot{x}_1 = -\gamma(x_2 - x_3) \\ \dot{x}_2 = \gamma(x_1 + 0,2x_2) \\ \dot{x}_3 = \gamma[0,2 + x_3(x_1 - 5,7)] \end{cases} \quad (Eq. 3)$$

$$\text{Lorenz (resposta), } \dot{\vec{y}} \equiv G_\beta(\vec{x}, \vec{y}): \begin{cases} \dot{y}_1 = 10(y_2 - y_1) \\ \dot{y}_2 = 28y_1 - y_2 - y_1y_3 + \beta x_2^2 \\ \dot{y}_3 = y_1y_2 - 8y_3/3 \end{cases} \quad (Eq. 4)$$

onde β define o vínculo entre os sistemas e $\gamma = 6$. A equação que segue é como detectar a existência de uma relação causal do tipo $\vec{y} = M_\beta(\vec{x})$. Se existir uma relação assim, como consequência, o sistema resposta irá “esquecer” suas condições iniciais. Desta forma, pode-se detectar o acoplamento entre (3) e (4) como a inclusão de um sistema auxiliar $\vec{z} = G_\beta(\vec{x}, \vec{z})$. Outro método multivariado que serve para detectar a sincronização em séries temporais é o diagrama de recorrência conjunto é determinado por

$$\mathcal{R}_{ij}(\Theta) = \Theta(\varepsilon_x - \|\vec{x}_i - \vec{x}_j\|) \cdot \Theta(\varepsilon_y - \|\vec{y}_i - \vec{y}_j\|),$$

onde $\vec{x} \in \mathbb{R}^n$ e $\vec{y} \in \mathbb{R}^m$ e Θ é a função de Heaviside. Esta proposta apresenta a vantagem de poder analisar séries temporais com diferentes magnitudes. O problema dessa abordagem, em sistemas multivariados com n séries temporais, é que com apenas uma função de Heaviside com valor zero pode-se anular todo o produtório de um par (i, j) específico, mesmo que as outras $n - 1$ funções de Heaviside sejam não-nulas. Com um esquema similar propõe-se

$$\mathcal{R}_{ij}(\Lambda)\Sigma = \prod_{l=1}^n \Lambda(\varepsilon_l - \|\vec{x}_{li} - \vec{x}_{lj}\|),$$

onde $x_{l=1,i} \equiv x_i, x_{l=2,i} \equiv y_i, x_{l=3,i} \equiv z_i$ e assim por diante. A função Λ pode ser definida como

$$\Lambda(x) = \frac{1}{1 + \exp[(x - \tilde{x})/\nu]},$$

sendo monotonicamente decrescente, com os parâmetros $\tilde{x}$ e ν especificando a inflexão e a declividade de Λ , respectivamente.

7.5 TRANSFORMADA EM ONDELETAS (WAVELETS)

Matematicamente, o termo “ondeletas” significa o conjunto de funções em forma de ondas compactas geradas a partir de dilatações e translações de uma função geradora simples (usualmente representada por ψ), conhecida como ondeleta primária. A transformada em ondeletas continua de uma função f é escrita como

$$\omega_{ab} = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \psi_{ab}^*(t) dt ,$$

onde $\psi_{ab}(t) = a^{-1/2} \psi(a^{-1}(t - b))$, $a \in \mathbb{R}^+$ é o parâmetro de escala, $b \in \mathbb{R}$ é o parâmetro de translação e $*$ denota o complexo conjugado. Em sua forma discreta, a transformada em ondeletas é dada por

$$\omega_{jk} = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \Psi_{jk}^*(t) dt , \text{ tal que } j, k \in \mathbb{Z} ,$$

onde $\Psi_{jk}(t) = 2^{j/2} \Psi(2^j t - k)$, $a \equiv 2^{-j}$ e $b \equiv 2^{-j} k$, de modo a garantir uma base ortonormal completa em $\mathcal{L}^2(\mathbb{R})$.

Define-se o espectro de ondeletas como a integral dos coeficientes quadráticos sobre b , i.e.,

$$s_a = \int_{-\infty}^{\infty} |\omega_{ab}|^2 db .$$

Por analogia ao espectro de potências não é difícil concluir que a equação acima pode ser interpretada como a contribuição de energia da escala a à energia total da função f . A representação gráfica de $|\omega_{ab}|^2$ no semiplano (a, b) é denominada usualmente de escalograma.

Outro conceito interessante na área de ondeletas é o de análise de multiresolução. Para efetuar uma representação multiresolução, necessita-se de uma sequência crescente de subespaços que verifica $V_{-\infty} \dots \subset V_{-1} \subset V_0 \subset V_1 \subset V_{\infty}$. A função responsável pela geração das ondeletas, conhecida como função escala é solução denominada equação de dilatação.

$$\phi(t) = \sqrt{2 \sum_k \ell_k} \phi(2t - k),$$

Comparação entre as transformadas de Fourier e em ondeletas para duas funções compostas por senóides de frequências ω_1 e $\omega_2 = 3/2\omega_1$ com comportamentos temporais distintos. Verifica-se que a reconstrução a partir do espectro de potências não é adequada para recuperação da função $f(\omega_1, t \leq t_c) + g(\omega_2, t > t_c)$. No caso de espectro de ondeletas, percebe-se claramente no semiplano (a, b) que a informação a respeito da mudança de frequência em t_c é preservada na transformação. Nos gráficos intermediários, ilustram-se os respectivos espectros de potências $s(\omega) = |\int f(t) \exp(-i2\pi\omega t) dt|^2$.

Desta equação, pode-se construir uma família ortogonal em $\mathcal{L}^2(\mathbb{R})$ definida por $\phi_{jk}(t) = 2^{j/2} \phi(2^j t - k)$, de onde obtém-se $\ell_k = \langle \phi_{1k} | \phi \rangle \in \mathbb{R}$.

A função ϕ e as suas translações inteiras ϕ_k formam uma base do subespaço V_0 . Como consequência a família de funções ϕ_{1k} , forma uma base para o subespaço V_1 . Como consequência a família de funções ϕ_{1k}

forma uma base para o subespaço V_1 . Para obter a aproximação $P_{j-1}f$ de uma função $f \approx P_j f \in V_j$, efetua-se a projeção de f no subespaço V_{j-1} , fazendo

$$P_{j-1}f(t) = \sum_k a_{j-1,k} \phi_{j-1,k}(t) ,$$

onde os coeficientes de aproximação $a_{j-1,k}$ são determinados por:

$$a_{j-1,k} = \langle \phi_{j-1,k} | P_j f \rangle = \sum_m a_{jm} \langle \phi_{j-1,k} | \phi_{jm} \rangle = \sum_m \ell_{m-2k} a_{jm} .$$

Além da função escala ϕ há uma outra importante função, definida agora em W_0 . Trata-se da ondeleta primária ψ . Esta função, em conjunto com todas as suas translações inteiras ψ_k constitui uma base em W_0 . Sabendo que $W_0 \subset V_1$, a função ψ pode ser escrita como:

$$\psi(t) = \sqrt{2 \sum_k h_k} \phi(2t - k) , \text{ onde } h_k = \langle \phi_{1k} | \psi \rangle \in \mathbb{R} .$$

Os coeficientes de filtro ℓ_k e h_k devem estar relacionados de modo a garantir a desejada ortogonalidade entre os subespaços V_0 e W_0 . Define-se o subespaço W_{j-1} como o complemento orthogonal de V_{j-1} em V_j .

As ondeletas ψ_{jk} formam uma base do subespaço W_j . É possível afirmar que o conjunto de todas as translações e dilatações de ψ constitui uma base orthogonal completa no espaço $\mathcal{L}^2(\mathbb{R})$, $\langle \psi_{jk} | \psi_{mn} \rangle = \delta_{jm} \delta_{kn}$. Passando do nível $j - 1$ para j aumenta-se a resolução. É possível mostrar que as projeções $P_j f$ tendem a representar de uma forma cada vez mais

exata a função f à medida que o valor do parâmetro de escala j aumenta.

Os coeficientes de ondeleta $\omega_{j-1,k}$ são determinados fazendo

$$\omega_{j-1,k} = \langle \psi_{j-1,k} | P_j f \rangle = \sum_m a_{jm} \langle \psi_{j-1,k} | \phi_{jm} \rangle = \sum_m h_{m-2k} a_{jm} .$$

Considerando que $P_j f = P_{j+1} f - Q_j f = P_\infty f - \sum_m Q_m f$, para $m \geq j$. Na análise multiresolução verifica-se que $\lim_{m \rightarrow \infty} P_m f \equiv f$, logo os coeficientes $\omega_{j-1,k}$ podem ser reescritos como $\langle \psi_{j-1,k} | f \rangle$, pois $\langle \psi_{j-1,k} | \psi_{mn} \rangle = 0$.

A reconstrução da função original é obtida diretamente da relação

$$a_{jm} = \sum_k \ell_{m-2k} a_{j-1,k} + h_{m-2k} w_{j-1,k} ,$$

Lembrando que $P_j f = \sum_m a_{jm} \phi_{jm}$.

Esta forma de decompor e recompor funções pode ser implementada de uma forma muito eficaz por meio do algoritmo pyramidal. Na expressão abaixo, mostra-se uma adaptação desta técnica para filtragem de ruído em series temporais. No que concerne à sincronização, uma possibilidade interessante é avaliar as fases do sinal por meio da decomposição em escalas. Estas são definidas por

$$\theta_{ab} = \tan^{-1} \frac{\text{Im}(\omega_{ab})}{\text{Re}(\omega_{ab})} ,$$

que obrigatoriamente requer uma ondeleta primária complexa. Esta abordagem pode revelar uma “microestrutura” de sincronização oculta quando se avalia a fase pela transformada de Fourier.

7.6 SINCRONIA DE FASE

A sincronia de atividade neuronal associada a padrões oscilatórios periódicos poderia ser avaliada por meio da função de coerência espectral clássica, mas requer trechos relativamente longos de sinais estacionários, ou seja, que características estatísticas não se alterem em pequenos trechos. A sincronia de fase pode ser estudada ou evidenciada nos domínios da frequência e do tempo, tendo como particularidade importante proporcionar maior resolução temporal, portanto aplicável a séries temporais não estacionárias.

A sincronização em sua definição clássica entre dois osciladores pode ser estudada medindo se existe ou não sincronia de fase (“*phase-locking*”) entre eles. Assim, para dois sinais $x_1(t)$, $x_2(t)$ e, suas respectivas fases $\phi_1(t)$, $\phi_2(t)$ existirá amarração de fase se $n\phi_1(t) - m\phi_2(t) = \text{constante}$, em que n , m são inteiros que indicam a razão fixa de frequências. Na prática pode-se supor que $n = m = 1$, ou seja, ambos os sinais têm a mesma frequência, mas em geral os ritmos biológicos não têm frequência constante. Assim a condição mais razoável de teste seria $|n\phi_1(t) - m\phi_2(t)| \approx \text{constante}$. Ou seja, na prática é necessário estimar a fase instantânea de cada sinal e estabelecer critério estatístico para quantificar o grau de “*phase-locking*”. Há dois procedimentos correntemente usados na prática: a) convolução por wavelet complexo e b) transformada de Hilbert (Le Van Quyen, Foucher 2001).

Figura 1. Funções (A) Gabor usada no método de Wavelet e (B) $1/\pi t$ convoluída na transformada de Hilbert (Le Van Quyen et al., 2001).

No método de wavelet utiliza-se a função de Gabor (vide Figura

1A acima) definida por $\Psi_{\tau,f}(u) = \sqrt{f} e^{i2\pi f(u-\tau)} e^{-\frac{(u-\tau)^2}{2\sigma^2}}$ que pela escolha dos parâmetros f , σ e número de ciclos de oscilação n define-se a resolução temporal e em frequência do método. Enquanto poderia se esperar que o método da transformada de Hilbert fornecesse melhor resultado na análise de sinais com descargas e potenciais de ação devido à morfologia da função de convolução (Figura 1B). No entanto, diversos estudos têm demonstrado essencialmente que ambos os métodos fornecem medidas satisfatórias e similares de sincronia de fase.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vanderwolf CH. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1969 Apr;26(4):407-18.
2. Gavrilov VV, Wiener SI, Berthoz A. Enhanced hippocampal theta EEG during whole body rotations in awake restrained rats. *Neuroscience Letters*. 1995;197(3):239-41
3. Slawinska U, Kasicki S. The frequency of rat's hippocampal theta rhythm is related to the speed of locomotion. *Brain Research*. 1998;796:327-31.
4. Timo-laria C, Negrao N, Schmidek WR, Hoshino K, Lobato de Menezes CE, Leme da Rocha T. Phases and states of sleep in the rat. *Physiol Behav*. 1970 Sep;5(9):1057-62.
5. Timo-laria C, Yamashita R, Hoshino K, Souza-Melo A. Rostrum movements in desynchronized sleep as a prevalent manifestation of dreaming activity in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res*. 1990;23(6-7):617-20.
6. Jung R, Kornmuller A. Eine Methodik der Ableitung lokalisierter Potential-Schwankungen aus subkortikalen. *Arch Psychiatr Nervenkr*. 1938;109:1-30.
7. Green JD, Arduini AA. Hippocampal electrical activity in arousal. *J Neurophysiol*. 1954 Nov;17(6):533-57.
8. Ekstrom AD, Caplan JB, Ho E, Shattuck K, Fried I, Kahana MJ. Human hippocampal theta activity during virtual navigation. *Hippocampus*. 2005;15(7):881-9.
9. Kahana MJ, Sekuler R, Caplan JB, Kirschen M, Madsen JR. Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze navigation. *Nature*. 1999 Jun 24;399(6738):781-4.
10. Raghavachari S, Kahana MJ, Rizzuto DS, Caplan JB, Kirschen MP, Bourgeois B, et al. Gating of human theta oscillations by a working memory task. *J Neurosci*. 2001 May 1;21(9):3175-83.
11. Sasaki K, Tsujimoto T, Nambu A, Matsuzaki R, Kyuhou S. Dynamic activities of the frontal association cortex in calculating and thinking. *Neurosci Res*. 1994 Mar;19(2):229-33.
12. Sasaki K, Tsujimoto T, Nishikawa S, Nishitani N, Ishihara T. Frontal mental theta wave recorded simultaneously with magnetoencephalography and electroencephalography. *Neurosci Res*. 1996 Sep;26(1):79-81.
13. Yamaguchi Y. A theory of hippocampal memory based on theta phase precession. *Biol Cybern*. 2003 Jul;89(1):1-9.
14. Wiebe SP, Staubli UV. Recognition memory correlates of hippocampal theta cells. *J Neurosci*. 2001 Jun 1;21(11):3955-67.
15. Bastiaansen M, Hagoort P. Event-induced theta responses as a window on the dynamics of memory. *Cortex*. 2003 Sep-Dec;39(4-5):967-92.
16. Morrell F. Electrophysiological contributions to the neural basis of learning. *Physiol Rev*. 1961 Jul;41:443-94.
17. Elazar Z, Adey WR. Electroencephalographic correlates of learning in subcortical and cortical structures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1967 Oct;23(4):306-19.

18. Landfield PW, McGaugh JL. Effects of electroconvulsive shock and brain stimulation on EEG cortical theta rhythms in rats. *Behav Biol.* 1972 Apr;7(2):271-8.
19. Landfield PW. Computer-determined EEG patterns associated with memory-facilitating drugs and with ECS. *Brain Res Bull.* 1976 Jan-Feb;1(1):9-17.
20. Winson J. Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science.* 1978 Jul 14;201(4351):160-3.
21. McNaughton N, Ruan M, Woodnorth MA. Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze. *Hippocampus.* 2006;16(12):1102-10.
22. Staubli U, Lynch G. Stable hippocampal long-term potentiation elicited by 'theta' pattern stimulation. *Brain Res.* 1987 Dec 1;435(1-2):227-34.
23. Huerta PT, Lisman JE. Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature.* 1993 Aug 19;364(6439):723-5.
24. Vertes RP, Kocsis B. Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience.* 1997 Dec;81(4):893-926.
25. Huerta PT, Lisman JE. Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron.* 1995 Nov;15(5):1053-63.
26. Greenstein YJ, Pavlides C, Winson J. Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity. *Brain Res.* 1988 Jan 12;438(1-2):331-4.
27. Heinbockel T, Pape HC. Input-specific long-term depression in the lateral amygdala evoked by theta frequency stimulation. *J Neurosci.* 2000 Apr 1;20(7):RC68.
28. Rodriguez E, George N, Lachaux JP, Martinerie J, Renault B, Varela FJ. Perception's shadow: long-distance synchronization of human brain activity. *Nature.* 1999 Feb 4;397(6718):430-3.
29. Kocsis B, Di Prisco GV, Vertes RP. Theta synchronization in the limbic system: the role of Gudden's tegmental nuclei. *Eur J Neurosci.* 2001 Jan;13(2):381-8.
30. Buzsaki G. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus.* 2005;15(7):827-40.
31. Ribeiro S, Gervasoni D, Soares ES, Zhou Y, Lin SC, Pantoja J, et al. Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas. *PLoS Biol.* 2004 Jan;2(1):E24.
32. Ahmed AK, Dong K, Sugioka K, Yamadori T. Afferent projections to the cingulate cortex in albino rats: a study with a retrograde labeling method using fluoro-gold. *Kobe Journal of Medical Sciences.* 1995 Dec;41(6):247-55.
33. Siapas AG, Lubenov EV, Wilson MA. Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron.* 2005 Apr 7;46(1):141-51.
34. Dalle-Lucca JJ, Timo-laria C. Theta waves in the Papez circuit during alertness and dreaming in the rat. *Braz J Med Biol Res.* 1992;25(7):751-5.

35. Colom LV, Bland BH. Medial septal cell interactions in relation to hippocampal field activity and the effects of atropine. *Hippocampus*. 1991 Jan;1(1):15-30.
36. Kirk IJ, McNaughton N. Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. *Neuroreport*. 1991 Nov;2(11):723-5.
37. Kocsis B, Vertes RP. Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat. *J Neurosci*. 1994 Nov;14(11 Pt 2):7040-52.
38. Bland BH, Konopacki J, Kirk IJ, Oddie SD, Dickson CT. Discharge patterns of hippocampal theta-related cells in the caudal diencephalon of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol*. 1995 Jul;74(1):322-33.
39. Mitchell SJ, Rawlins JN, Steward O, Olton DS. Medial septal area lesions disrupt theta rhythm and cholinergic staining in medial entorhinal cortex and produce impaired radial arm maze behavior in rats. *J Neurosci*. 1982 Mar;2(3):292-302.
40. Frank LM, Brown EN, Wilson MA. A comparison of the firing properties of putative excitatory and inhibitory neurons from CA1 and the entorhinal cortex. *J Neurophysiol*. 2001 Oct;86(4):2029-40.
41. Kocsis B, Vertes RP. Midbrain raphe cell firing and hippocampal theta rhythm in urethane-anaesthetized rats. *Neuroreport*. 1996 Nov 25;7(18):2867-72.
42. Viana Di Prisco G, Albo Z, Vertes RP, Kocsis B. Discharge properties of neurons of the median raphe nucleus during hippocampal theta rhythm in the rat. *Exp Brain Res*. 2002 Aug;145(3):383-94.
43. Hyman JM, Zilli EA, Paley AM, Hasselmo ME. Medial prefrontal cortex cells show dynamic modulation with the hippocampal theta rhythm dependent on behavior. *Hippocampus*. 2005;15(6):739-49.
44. Oddie SD, Bland BH, Colom LV, Vertes RP. The midline posterior hypothalamic region comprises a critical part of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathway. *Hippocampus*. 1994 Aug;4(4):454-73.
45. Kirk IJ, Oddie SD, Konopacki J, Bland BH. Evidence for differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending and descending pathways. *J Neurosci*. 1996 Sep 1;16(17):5547-54.
46. Martin JH. *Neuroanatomy: text and atlas*: Elsevier; 1989.
47. Petsche H, Stumpf C, Gogolak G. The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1962 Apr;14:202-11.
48. Tombol T, Petsche H. The histological organization of the pacemaker for the hippocampal theta rhythm in the rabbit. *Brain Res*. 1969 Feb;12(2):414-26.
49. O'Keefe J, Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Clarendon Press; 1978.
50. Buzsaki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*. 2002 Jan 31;33(3):325-40.

51. Nerad L, McNaughton N. The septal EEG suggests a distributed organization of the pacemaker of hippocampal theta in the rat. *Eur J Neurosci.* 2006 Jul;24(1):155-66.
52. Orban G, Kiss T, Lengyel M, Erdi P. Hippocampal rhythm generation: gamma-related theta-frequency resonance in CA3 interneurons. *Biol Cybern.* 2001 Feb;84(2):123-32.
53. Vertes RP. A lectin horseradish peroxidase study of the origin of ascending fibers in the medial forebrain bundle of the rat. The upper brainstem. *Neuroscience.* 1984 Mar;11(3):669-90.
54. Vertes RP. Brainstem afferents to the basal forebrain in the rat. *Neuroscience.* 1988 Mar;24(3):907-35.
55. Shepard PD, Mihailoff GA, German DC. Anatomical and electrophysiological characterization of presumed dopamine-containing neurons within the supramammillary region of the rat. *Brain Res Bull.* 1988 Mar;20(3):307-14.
56. Vertes RP. PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1992 Dec 22;326(4):595-622.
57. Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM. Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus. *Anat Embryol (Berl).* 1979 Jun 5;156(2):165-76.
58. Room P, Groenewegen HJ. Connections of the parahippocampal cortex in the cat. II. Subcortical afferents. *J Comp Neurol.* 1986 Sep 22;251(4):451-73.
59. Swanson LW, Cowan WM. The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol.* 1979 Aug 15;186(4):621-55.
60. Swanson LW, Cowan WM. Hippocampo-hypothalamic connections: origin in subicular cortex, not ammon's horn. *Science.* 1975 Jul 25;189(4199):303-4.
61. Gonzalo-Ruiz A, Alonso A, Sanz JM, Llinas RR. Afferent projections to the mammillary complex of the rat, with special reference to those from surrounding hypothalamic regions. *J Comp Neurol.* 1992 Jul 8;321(2):277-99.
62. Azzaroni A, Parmeggiani PL. Feedback regulation of the hippocampal theta-rhythm. *Helv Physiol Pharmacol Acta.* 1967;25(3):309-21.
63. Vertes RP, Albo Z, Viana Di Prisco G. Theta-rhythmically firing neurons in the anterior thalamus: implications for mnemonic functions of Papez's circuit. *Neuroscience.* 2001;104(3):619-25.
64. Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsaki G. Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience.* 1994 Oct;62(4):1033-47.
65. King C, Recce M, O'Keefe J. The rhythmicity of cells of the medial septum/diagonal band of Broca in the awake freely moving rat: relationships with behaviour and hippocampal theta. *Eur J Neurosci.* 1998 Feb;10(2):464-77.
66. Kocsis B, Bragin A, Buzsaki G. Interdependence of multiple theta generators in the hippocampus: a partial coherence analysis. *J Neurosci.* 1999 Jul 15;19(14):6200-12.

67. Denham MJ, Borisyuk RM. A model of theta rhythm production in the septal-hippocampal system and its modulation by ascending brain stem pathways. *Hippocampus*. 2000;10(6):698-716.
68. Wolansky T, Clement EA, Peters SR, Palczak MA, Dickson CT. Hippocampal slow oscillation: a novel EEG state and its coordination with ongoing neocortical activity. *J Neurosci*. 2006 Jun 7;26(23):6213-29.
69. Stumpf C. THE FAST COMPONENT IN THE ELECTRICAL ACTIVITY OF RABBIT'S HIPPOCAMPUS. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1965;18:477-86.
70. Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G. Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *The Journal of Neuroscience*. 1995;15:47-60.
71. Adrian E. Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *The Journal of Physiology*. 1942;100:459-73.
72. Adrian E. The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1950;2:377-88.
73. Freeman WJ. Mass action in the nervous system. Press A, editor. New York 1975.
74. Freeman WJ. A physiological hypothesis on perception. *Perspectives in Biology and Medicine*. 1981;24: 561-92.
75. Freeman WJ, Skarda CA. Spatial EEG Patterns, Non-linear Dynamics and Perception: the Neo-Sherringtonian View. *Brain Research Reviews*,. 1985;10:147-75.
76. Bouyer J, Montaron M, Rougeul A. Fast fronto-parietal rhythms during combined focused attentive behaviour and immobility in cat: cortical and thalamic localizations. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1981;51:244-52.
77. Gray CM, König P, Engel A, Singer W. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit intercolumnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature*. 1989;338:334-7.
78. Gray CM, Engel A, König P, Singer W. Synchronization of oscillatory neuronal responses in cat striate cortex: temporal properties. *Visual neuroscience*. 1992;8:337–47.
79. Eckhorn R, Bauer R, Jordan W, Brosch M, Kruse W, Munk M, et al. Coherent oscillations: a mechanism of feature linking in the visual cortex? Multiple electrode and correlation analyses in the cat. *Biological Cybernetics*. 1988;60:121-30.
80. Frien A, Eckhorn R, Bauer R, Woelbern T, Kehr H. Stimulus-specific fast oscillations at zero phase between visual areas V1 and V2 of awake monkey. *Neuroreport*. 1994;5:2273-7.
81. Kreiter AK, Singer W. Stimulus dependent synchronization of neuronal responses in the visual cortex of the awake macaque monkey. *The Journal of Neuroscience*. 1996;16:2381.
82. Gray CM, Viana Di Prisco G. Stimulus-dependent neuronal oscillations and local synchronization in striate cortex of the alert cat. *The Journal of Neuroscience*. 1997;17:3239-53.

83. Friedman-Hill S, Maldonado P, Gray C. Dynamics of striate cortical activity in the alert macaque: I. Incidence and stimulus-dependence of gamma-band neuronal oscillations. *Cerebral cortex*. 2000;10:1105-16.
84. Gray CM, Singer W. Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:1698-702.
85. Engel AK, König P, Gray CM, Singer W. Stimulus-Dependent Neuronal Oscillations in Cat Visual Cortex: Inter-Columnar Interaction as Determined by Cross-Correlation Analysis. *European Journal of Neuroscience*. 1990;2(7):588-606.
86. Livingstone MS. Oscillatory firing and interneuronal correlations in squirrel monkey striate cortex. *Journal of Neurophysiology*. 1996;75(6):2467-85.
87. König P, Engel AK, Roelfsema PR, Singer W. How Precise is Neuronal Synchronization? *Neural Computation*. 1995;7(3):469-85.
88. Gray CM. Synchronous oscillations in neuronal systems: mechanisms and functions. *Journal of Computational Neuroscience*. 1994;1:11-38.
89. Singer W, Gray C. Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*. 1995;18:555-86.
90. Buzsáki G, Leung LW, Vanderwolf CH. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Research*. 1983;287(2):139-71.
91. Leung LW, Lopes da Silva FH, Wadman WJ. Spectral characteristics of the hippocampal EEG in the freely moving rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1982;54(203):203-19.
92. Colgin LL, Moser EI. Gamma Oscillations in the Hippocampus. *Physiology*. 2010;25(5):319-29.
93. Wang XJ. Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition. *Physiological Reviews*. 2010;90(3):1195-268.
94. Başar E, Başar-Eroğlu C, Karakaş S, Schürmann M. Brain oscillations in perception and memory. *International Journal of Psychophysiology*. 2000;35(2-3):95-124.
95. Schürmann M, Başar-Eroğlu C, Kolev V, Başar E. A new metric for analyzing single-trial event-related potentials (ERPs) application to human visual P300 delta response. *Neuroscience Letters*. 1995;197:167-70.
96. Başar E, Başar-Eroğlu C, Karakaş S, Schürmann M. Are cognitive processes manifested in event-related gamma, alpha, theta and delta oscillations in the EEG? *Neuroscience Letters*. 1999;259:165-8.
97. Marshall L, Born J. The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends in Cognitive Sciences*. 2007;11(10):442-50.
98. Diekelmann S, Wilhelm I, Born J. The whats and whens of sleep-dependent memory consolidation. *Sleep Medicine Reviews*. 2009;13(5):309-21.
99. Başar-Eroğlu C, Başar E, Demiralp T, Schürmann M. P300-response: possible psychophysiological correlates in delta and theta frequency channels: a review. *International Journal of Psychophysiology*. 1992;13:161-79.

100. Stefanics G, Hangya B, Hernádi I, Winkler I, Lakatos P, Ulbert I. Phase Entrainment of Human Delta Oscillations Can Mediate the Effects of Expectation on Reaction Speed. *The Journal of Neuroscience*. 2010;30(41):13578-85.
101. Squire LR, Kandel ER. *Memória da mente às moléculas*. Porto Alegre: Artmed; 2003.
102. Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 100 years of consolidation - remembering Müller and Pilzecker. *Learning & Memory* 1999;6(2):77-87.
103. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências - desvendando o sistema nervoso* Porto Alegre: Artmed; 2008.
104. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957 Feb;20(1):11-21.
105. Schmolck H, Kensinger EA, Corkin S, Squire L. Semantic knowledge in Patient H.M. and other patients with bilateral medial and lateral temporal lobe lesions. *Hippocampus* 2002;12(4):520-33.
106. Corkin S. Acquisition of motor skill after bilateral medial temporal-lobe excision. *Neuropsychologia* 1968;6(6):255-65.
107. Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, deDavid e Silva T, Choi H, et al. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol*. 2002 Jun;22(3):269-87.
108. Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998;393(6686):635-6.
109. Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*. 2006;29:496-505.
110. Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*. 1999;103:1-11.
111. Fendt MS, Fanselow M. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 1999;23:743-60.
112. Blanchard RJ, Blanchard C. Defensive reactions in the albino rat. *Learning and Motivation*. 1971;2(4):351-62
113. Blanchard DC, Blanchard R. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of comparative and physiological psychology*. 1972;81(2):281-90.
114. Graeff FG, Brandão ML. *Neurobiologia das doenças mentais*. 4, editor. São Paulo: Editora lemos; 1999.
115. Bolles RC. Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychol Rev*. 1970;71:32-48.
116. Bolles RC, Uhl CN, Wolfe M, Chase PB. Stimulus learning versus response learning in a discriminated punishment situation. *Learning and Motivation*. 1975;6:439-47.
117. Fanselow MS, Sigmundi RA, Williams JL. Response selection and the hierarchical organization of species-specific defense reactions: The relationship between freezing, flight, and defensive burying. *Psychological Record*. 1987;37:381-6.

118. Bolles RC, Collier AC. The effect of predictive cues of freezing in rats. *Animal Learning and Behavior*. 1976;4:6-8.
119. Blanchard RJ, Fukunaga KK, Blanchard DC. Environmental control of defensive reactions to footshock. *Psychon Bull Rev*. 1976;8(2):129-30.
120. Brandão ML, Troncoso AC, de Souza Silva MA, Huston JP. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463:225-33.
121. Fanselow MS, Lester LS. Functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. Bolles RC, Beecher MD, editors. New York: Hillsdale; 1988.
122. Fanselow MS. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *The Pavlovian Journal of Biological Science*. 1980;15(4):177-82.
123. Fanselow MS. Naloxone attenuates rat's preference for signaled shock. *Physio-logical Psychology*. 1979;7:70-4.
124. Young SL, Fanselow MS. Associative regulation of Pavlovian fear conditioning: unconditional stimulus intensity, incentive shifts, and latent inhibition. *Journal of Experimental Psychology Animal Behavior Processes* 1992;18(4):400-13.
125. Aston-Jones G, Cohen JD. Adaptive Gain and the Role of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System in Optimal Performance. *The Journal of Comparative Neurology*. 2005;493(1):99-110.
126. LeDoux JE. The amygdala. *Current Biology*. 2007;17(20):R868-R74.
127. Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM. The Influence of Stress Hormones on Fear Circuitry. *Annual Review of Neuroscience*. 2009;32:289-313
128. Bolles RC, Fanselow MS. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral and Brain Sciences*. 1980;3(2):291-301.
129. LeDoux JE, Sakaguchi A, Reis DJ. Subcortical efferent projections of the geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *The Journal of Neuroscience* 1984;4:683-98.
130. Richardson R, Wang P, Campbell BA. Delayed development of conditioned heart rate responses to auditory stimuli in the rat. *Developmental Psychobiology*. 1995;28:221-38.
131. Iwata J, LeDoux JE. Dissociation of associative and nonassociative concomitants of classical fear conditioning in the freely behaving rat. *Behavioral Neuroscience*. 1988;102:66-76.
132. Kaltwasser MT. Acoustic startle induced ultrasonic vocalization in the rat: a novel animal model of anxiety. *Behavioural Brain Research* 1991;43:133-7.
133. Miczek KA, Weerts EM, Vivian JA, Barros HM. Aggression anxiety and vocalizations in animals: GABAA and 5-HT anxiolytics. *Psychopharmacology*. 1995;121:38-56.
134. Borszcz GS. Pavlovian conditional vocalizations of the rat: A model system for analyzing the fear of pain. *Behavioral Neuroscience*. 1995;109:648-62.

135. LeDoux JE. The emotional brain: the mysterious underpinnings of emotional life. New York: Simon & Schuster; 1996.
136. Griffith CR. The behavior of white rats in the presence of cats Psychobiology. 1920;2(1):19-28
137. Small W. Notes on the psychic development of the white rat. American Journal of Psychology. 1899;11:80–100.
138. Darwin C. The expression of the emotions an man and animals: University of Chicago Press; 1960.
139. Kim JJ, Rison RA, Fanselow MS. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. Behav Neurosci. 1993 Dec;107(6):1093-8.
140. Kapp BS, Frysinger RC, Gallagher M, Haselton JB. Amygdala central nucleus lesions: effect on heart rate conditioning in the rabbit. Physiology & Behavior. 1979;23:1109-17.
141. LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. The Journal of Neuroscience. 1988;8(7):2517-9.
142. Helmstetter FJ, Bellgowan PS. Lesions of the amygdala block conditional hypoalgesia on the tail flick test. Brain Research,. 1993;612:253-7.
143. SWANSON LW. The Amygdala and Its Place in the Cerebral Hemisphere. Annals of the New York Academy of Sciences. 2003;985:174-84.
144. Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. Annals of the New York Academy of Sciences. 2000;911:369-91.
145. Fanselow M. From contextual fear to a dynamic view of memory systems. Trends in Cognitive Sciences. 2009;14(1):7-15.
146. SAH P, FABER ESL, LOPEZ DE ARMENTIA M, POWER J. The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. Physiological Reviews. 2003;83:803-34.
147. LeDoux JE. Emotion: Clues from the Brain. Annual Review of Psychology. 1995;46:209-35.
148. LeDoux JE. Emotion, memory and the brain. Scientific American. 1994;270(6):32-9.
149. Fanselow MS, Poulos AM. The Neuroscience of Mammalian Associative Learning. Annual Review of Psychology. 2005;56:207-34.
150. Lang PJ, Davis M. Emotion, motivation, and the brain: reflex foundations in animal and human research. Progress in Brain Research 2006;156:3-29.
151. Maren S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. Annual Review of Neuroscience. 2001;24:897-931.
152. Paré D, Quirk GJ, Ledoux JE. New Vistas on Amygdala Networks in Conditioned Fear. Journal of Neurophysiology. 2004;92:1-9.
153. Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE. Molecular Mechanisms Underlying Emotional Learning and Memory in the Lateral Amygdala. Neuron. 2004;44(1):75-91.

154. LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*. 2000;23:155-84.
155. Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences*. 1997;20(11):517-23.
156. Likhtik E, Popa D, Apergis-Schoute J, Fidacaro GA, Paré D. Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction. *Nature*. 2008;454:642-5.
157. McDonald AJ. Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat. *Neuroscience*. 1991;44:15-33.
158. Ji J, Maren S. Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction. *Hippocampus*. 2007;17:749-58.
159. Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*. 1992 Apr;106(2):274-85.
160. Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*. 1992 May 1;256(5057):675-7.
161. McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*. 1998;55:257-332.
162. McDonald AJ, Mascagnia F, Guo L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat *Neuroscience*. 1996;71:55-75.
163. Price JL. Comparative Aspects of Amygdala. Connectivity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;985:50-8.
164. Lee JL, Dickinson A, Everitt BJ. Conditioned suppression and freezing as measures of aversive Pavlovian conditioning: effects of discrete amygdala lesions and overtraining. 2005;159:221-33.
165. Maren S. Neurotoxic Basolateral Amygdala Lesions Impair Learning and Memory But Not the Performance of Conditional Fear in Rats. *The Journal of Neuroscience*. 1999;19(19):8696-703.
166. Zimmerman JM, Rabinak CA, McLachlan IG, Maren S. The central nucleus of the amygdala is essential for acquiring and expressing conditional fear after overtraining. *Learning & Memory* 2007;14(9):634–44.
167. Anglada-Figueroa D, Quirk GJ. Lesions of the basal amygdala prevent recall of conditioned fear, but not extinction. *The Journal of Neuroscience*. 2005;25:9680-5.
168. Balleine BW, Killcrossb S. Parallel incentive processing: an integrated view of amygdala function. *Trends in Neurosciences*. 2006;29(5):272-9.
169. Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2002;26:321-52.
170. Fanselow MS, DeCola JP, De Oca BM, Landeira-Fernandez J. Ventral and dorsolateral regions of the midbrain periaqueductal gray (PAG) control different stages of defensive behavior : dorsolateral PAG lesions enhance the defensive freezing produced by massed and immediate shock. *Aggressive Behavior*. 1995;21(1):63 - 77.

171. De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow MS. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *The Journal of Neuroscience*. 1998;18(9):3426-32.
172. Quirk GJ, Garcia R, González-Lima F. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biological Psychiatry*. 2006;60(4):337-43.
173. Rosenkranz JA, Moore H, Grace AA. The Prefrontal Cortex Regulates Lateral Amygdala Neuronal Plasticity and Responses to Previously Conditioned Stimuli *The Journal of Neuroscience*. 2003;23(35):11054-64.
174. Sotres-Bayon F, Bush DEA, LeDoux JE. Emotional Perseveration: An Update on Prefrontal-Amygdala Interactions in Fear Extinction Learning & Memory. 2004;11:525-35.
175. Gibbs CM, Powell DA. Neuronal correlates of classically conditioned bradycardia in the rabbit: studies of the medial prefrontal cortex. *Brain Research*. 1988;442:86-96.
176. Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K. The Role of Ventromedial Prefrontal Cortex in the Recovery of Extinguished Fear. *The Journal of Neuroscience*. 2000;20(16):6225-31.
177. Disterhoft JF, Olds J. Differential development of conditioned unit changes in thalamus and cortex of rat. *Journal of Neurophysiology*. 1972;35:665-79.
178. Gilmartin MR, McEchron MD. Single neurons in the medial prefrontal cortex of the rat exhibit tonic and phasic coding during trace fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*. 2005;119(6):1496-510.
179. Shadlen MN, Newsome WT. Noise, neural codes and cortical organization. *Current Opinion in Neurobiology*. 1994;4:569-79.
180. Vidal-Gonzalez, I., Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learning & Memory*. 2006;13:728-33
181. Sotres-Bayon F, Cain CK, LeDoux JE. Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. *Biological Psychiatry*. 2006;60:329-36.
182. Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ. Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology* [serial on the Internet]. 2010.
183. Paxinos G, Watson G. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4 ed. Sidney: Academic Press; 1998.
184. Blum S, Hebert AE, Dash PK. A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport*. 2006;17(3):341-4.
185. Choi DC, Maguschak KA, Ye K, Jang SW, Myers KM, Ressler KJ. Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(6):2675-80.
186. Corcoran KA, Quirk GJ. Activity in Prelimbic Cortex Is Necessary for the Expression of Learned, But Not Innate, Fears *The Journal of Neuroscience*. 2007;27(4):840-4.

187. Laurent V, Westbrook RF. Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. *Learning & Memory*. 2009;16:520-9.
188. McDonald AJ. Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience*. 1991;44:1-14.
189. Laviolette SR, Lipski WJ, Grace AA. A subpopulation of neurons in the medial prefrontal cortex encodes emotional learning with burst and frequency codes through a dopamine D4 receptor-dependent basolateral amygdala input. *The Journal of Neuroscience*. 2005;25:6066-75.
190. Herry C, Ciocchi S, Senn V, Demmou L, Müller C, Lüthi A. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature*. 2008;454:600-6.
191. Maren S, Aharonov G, Fanselow MS. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behavioural Brain Research*. 1997;88:261-74.
192. Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*. 2000;10:411-9.
193. Vertes RP. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*. 2004;51:32-58.
194. Likhtik E, Pelletier JG, Paz R, Paré D. Prefrontal control of the amygdala. *The Journal of Neuroscience*. 2005;25:7429-37.
195. Maren S, Quirk GJ. Neuronal signalling of fear memory *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5:844-52.
196. Quirk GJ, Repa C, LeDoux JE. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron*. 1995;15:1029-39.
197. Paré D, Collins DR. Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. *The Journal of Neuroscience*. 2000;20:2701-10.
198. Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Quirk GJ. Sustained Conditioned Responses in Prelimbic Prefrontal Neurons Are Correlated with Fear Expression and Extinction Failure. *The Journal of Neuroscience*. 2009;29(26):8474-82.
199. Knapska E, Maren S. Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. *Learning & Memory*. 2009;16(8):486-93.
200. Rodriguez-Romaguera J, Sotres-Bayon F, Mueller D, Quirk GJ. Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction. *Biological Psychiatry*. 2009;65(10):887-92.
201. Lemos JI, Resstel LB, Guimarães FS. Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behavioural Brain Research*. 2010;207(1):105-11.
202. Quirk GJ, Mueller D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:56-72.
203. Papez JW. A proposed mechanism of emotion. *Cogn Brain Res*. 1937;38:725-34.

204. Johansen JP, Fields HL, Manning BH. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 3;98(14):8077-82.
205. Lorberbaum JP, Newman JD, Horwitz AR, Dubno JR, Lydiard RB, Hamner MB, et al. A potential role for thalamocingulate circuitry in human maternal behavior. *Biol Psychiatry*. 2002 Mar 15;51(6):431-45.
206. Sander K, Frome Y, Scheich H. fMRI activations of amygdala, cingulate cortex, and auditory cortex by infant laughing and crying. *Hum Brain Mapp*. 2007 Oct;28(10):1007-22.
207. Duquette M, Roy M, Lepore F, Peretz I, Rainville P. Cerebral mechanisms involved in the interaction between pain and emotion. *Rev Neurol (Paris)*. 2007 Feb;163(2):169-79.
208. Yang JW, Shih HC, Shyu BC. Intracortical circuits in rat anterior cingulate cortex are activated by nociceptive inputs mediated by medial thalamus. *J Neurophysiol*. 2006 Dec;96(6):3409-22.
209. Hurt RW, Ballantine HT, Jr. Stereotactic anterior cingulate lesions for persistent pain: a report on 68 cases. *Clin Neurosurg*. 1974;21:334-51.
210. Kung JC, Su NM, Fan RJ, Chai SC, Shyu BC. Contribution of the anterior cingulate cortex to laser-pain conditioning in rats. *Brain Res*. 2003 Apr 25;970(1-2):58-72.
211. Riekkinen P, Jr., Kuitunen J, Riekkinen M. Effects of scopolamine infusions into the anterior and posterior cingulate on passive avoidance and water maze navigation. *Brain Res*. 1995 Jul 10;685(1-2):46-54.
212. Ragozzino ME, Kesner RP. The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and Prelimbic/Infralimbic cortices on spatial working memory. *Neurobiol Learn Mem*. 1998 May;69(3):241-57.
213. Kesner RP, Ragozzino ME. The role of the prefrontal cortex in object-place learning: a test of the attribute specificity model. *Behav Brain Res*. 2003 Nov 30;146(1-2):159-65.
214. Bush G, Whalen PJ, Rosen BR, Jenike MA, McInerney SC, Rauch SL. The counting Stroop: an interference task specialized for functional neuroimaging--validation study with functional MRI. *Hum Brain Mapp*. 1998;6(4):270-82.
215. Davis KD, Taylor KS, Hutchison WD, Dostrovsky JO, McAndrews MP, Richter EO, et al. Human anterior cingulate cortex neurons encode cognitive and emotional demands. *J Neurosci*. 2005 Sep 14;25(37):8402-6.
216. Phan KL, Liberzon I, Welsh RC, Britton JC, Taylor SF. Habituation of rostral anterior cingulate cortex to repeated emotionally salient pictures. *Neuropsychopharmacology*. 2003 Jul;28(7):1344-50.
217. Whalen PJ, Bush G, McNally RJ, Wilhelm S, McInerney SC, Jenike MA, et al. The emotional counting Stroop paradigm: a functional magnetic resonance imaging probe of the anterior cingulate affective division. *Biol Psychiatry*. 1998 Dec 15;44(12):1219-28.
218. Malin EL, Ibrahim DY, Tu JW, McGaugh JL. Involvement of the rostral anterior cingulate cortex in consolidation of inhibitory avoidance memory: interaction with the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem*. 2007 Feb;87(2):295-302.

219. Johansen JP, Fields HL. Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. *Nat Neurosci.* 2004 Apr;7(4):398-403.
220. Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain.* 1995 Feb;118 (Pt 1):279-306.
221. Allen GV, Hopkins DA. Mamillary body in the rat: topography and synaptology of projections from the subicular complex, prefrontal cortex, and midbrain tegmentum. *J Comp Neurol.* 1989 Aug 15;286(3):311-36.
222. Cassell MD, Wright DJ. Topography of projections from the medial prefrontal cortex to the amygdala in the rat. *Brain Res Bull.* 1986 Sep;17(3):321-33.
223. Royce GJ. Cortical neurons with collateral projections to both the caudate nucleus and the centromedian-parafascicular thalamic complex: a fluorescent retrograde double labeling study in the cat. *Exp Brain Res.* 1983;50(2-3):157-65.
224. Wyss JM, Sripanidkulchai K. The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulate cortex of the rat. *Brain Res.* 1984 Feb 13;293(1):1-15.
225. Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus.* 2001;11(1):8-17.
226. Rudy JW, Barrientos RM, O'Reilly RC. Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behav Neurosci.* 2002 Aug;116(4):530-8.
227. Rudy JW, Matus-Amat P. The ventral hippocampus supports a memory representation of context and contextual fear conditioning: implications for a unitary function of the hippocampus. *Behav Neurosci.* 2005 Feb;119(1):154-63.
228. Fanselow MS. Factors governing one-trial contextual conditioning. *Anim Learn Behav.* 1990;18:264-70.
229. Kiernan MJ, Westbrook RF. Effects of exposure to a to-be-shocked environment upon the rat's freezing response: evidence for facilitation, latent inhibition, and perceptual learning. *Q J Exp Psychol B.* 1993 Aug;46(3):271-88.
230. McIntyre CK, Miyashita T, Setlow B, Marjon KD, Steward O, Guzowski JF, et al. Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 26;102(30):10718-23.
231. Ammassari-Teule M, Pavone F, Castellano C, McGaugh JL. Amygdala and dorsal hippocampus lesions block the effects of GABAergic drugs on memory storage. *Brain Res.* 1991 Jun 14;551(1-2):104-9.
232. Maren S, Fanselow MS. Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 1997 Mar;67(2):142-9.
233. Rogers JL, Kesner RP. Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval of tone/shock-induced fear conditioning. *Learn Mem.* 2004 Jan-Feb;11(1):102-7.

234. Sacchetti B, Lorenzini CA, Baldi E, Tassoni G, Bucherelli C. Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala, and perirhinal cortex role in the consolidation of conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat. *J Neurosci*. 1999 Nov 1;19(21):9570-8.
235. Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci*. 1997 Jan;9(1):76-83.
236. Roozendaal B, Nguyen BT, Power AE, McGaugh JL. Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11642-7.
237. Frohardt RJ, Guarraci FA, Young SL. Intrahippocampal infusions of a metabotropic glutamate receptor antagonist block the memory of context-specific but not tone-specific conditioned fear. *Behav Neurosci*. 1999 Feb;113(1):222-7.
238. Roesler R, Vianna M, Sant' Anna MK, Kuyven CR, Kruel AV, Quevedo J, et al. Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiol Learn Mem*. 1998 Mar;69(2):87-91.
239. Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004 Nov;28(7):675-85.
240. Chang SD, Chen DY, Liang KC. Infusion of lidocaine into the dorsal hippocampus before or after the shock training phase impaired conditioned freezing in a two-phase training task of contextual fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem*. 2007 Sep 5.
241. Malin EL, McGaugh JL. Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 7;103(6):1959-63.
242. Fanselow MS, Kim JJ. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav Neurosci*. 1994 Feb;108(1):210-2.
243. Maren S, Fanselow MS. The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron*. 1996 Feb;16(2):237-40.
244. Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS. The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol*. 2003 Feb 28;463(1-3):217-23.
245. Sutherland RJ, McDonald RJ. Hippocampus, amygdala, and memory deficits in rats. *Brain Research*. 1990;37:57-79.
246. Jay TM, Witter MP. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *Journal of Comparative Neurology*. 1991;313:574-86.
247. Otani S. Prefrontal Cortex: from synaptic Plasticity to Cognition. Boston: Kluwer Academic 2004.

248. Verwer RW, Meijer RJ, Van Uum HF, Witter MP. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus*. 1997;7:397-402.
249. Öngür D, Price JL. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral cortex*. 2000;10:206-19.
250. Barbas H, Blatt GJ. Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus*. 1995;5:511-33.
251. Carmichael ST, Price JL. Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *Journal of Comparative Neurology*. 1995;363:615-41.
252. Goldman-Rakic PS, Selemon LD, Schwartz ML. Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neuroscience*. 1984;12:719-43.
253. Cenquizca LA, Swanson LW. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Research Reviews*. 2007;56:1-26.
254. Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*. 2004 May 7;304(5672):881-3.
255. Goupillaud P, Grossman A, Morlet J. Cycle-Octave and Related Transforms in Seismic Signal Analysis. *Geoexploration*. 1984;23:85-102.
256. Torrence C, Compo GP. A Practical Guide to Wavelet Analysis. *Bull Amer Meteor Soc*. 1998;79:61-78.
257. Le van Quyen M, Martinerie J, Adam C, Varela F. Dynamics of neuronal networks in epileptogenesis. *Physica D*. 1999;127:250-66.
258. Pikovsky A, Rosenblum M, Kurths J. Synchronization – A Universal Concept in Nonlinear Sciences Press CU, editor. Cambridge UK2001.
259. Sakaguchi H, Shinomoto S, Kuramoto Y. Local and global self-entrainments in oscillator-lattices. *Prog Theor Phys*. 1987;77:1005-10.
260. Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape H-C. Amygdalar and Hippocampal Theta Rhythm Synchronization During Fear Memory Retrieval. *Science*. 2003;301:846-50.
261. Fell J, Axmacher N. The role of phase synchronization in memory processes. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(2):105-18.
262. Squire LR, Alvarez P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol*. 1995 Apr;5(2):169-77.
263. McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev*. 1995 Jul;102(3):419-57.
264. Takehara K, Kawahara S, Kirino Y. Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *J Neurosci*. 2003 Oct 29;23(30):9897-905.

265. Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M. The Formation of Recent and Remote Memory Is Associated with Time-Dependent Formation of Dendritic Spines in the Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex. *The Journal of Neuroscience*. 2009;29(25):8206-14.
266. Frankland PW, Bontempi B. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Feb;6(2):119-30.
267. Mandile P, Giuditta A, Romano F, Montagnese P, Piscopo S, Cotugno M, et al. Waking EEG power spectra in the rat: correlations with training performance. *Brain Res Cogn Brain Res*. 2003 Jun;17(1):94-105.
268. Lakatos P, Shah AS, Knuth KH, Ulbert I, Karmos G, Schroeder CE. An Oscillatory Hierarchy Controlling Neuronal Excitability and Stimulus Processing in the Auditory Cortex. *Journal of Neurophysiology*. 2005;94:1904-11.
269. Lakatos P, Szilágyi N, Pincze Z, Rajkai C, Ulbert I, Karmos G. Attention and arousal related modulation of spontaneous gamma-activity in the auditory cortex of the cat. *Cognitive Brain Research*. 2004;19(1):1-9.
270. Amzica F, Steriade M. Cellular substrates and laminar profile of sleep K-complex. *Neuroscience*. 1998;82:671-86.
271. Freeman WJ, Rogers LJ. Fine Temporal Resolution of Analytic Phase Reveals Episodic Synchronization by State Transitions in Gamma EEGs. *The Journal of Neurophysiology* 2002;87(2): 937-45.
272. Steriade M, Contreras D, Amzica F, Timofeev I. Synchronization of Fast (30-40 Hz) Spontaneous Oscillations in Intrathalamic and Thalamocortical Networks. *The Journal of Neuroscience*. 1996;16(8):2788-808.
273. Vanhatalo S, Palva JM, Holmes MD, Miller JW, Voipio J, * KK. Infralow oscillations modulate excitability and interictal epileptic activity in the human cortex during sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(14):5053-7
274. Buzsáki G, Buhla DL, Harrisa KD, Csicsvaria J, Czéha B, Morozovb A. Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience*. 2003;116(1):201-11
275. Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G. Mechanisms of Gamma Oscillations in the Hippocampus of the Behaving Rat. *Neuron*. 2003;37(2):311-22.
276. Chrobak JJ, Buzsáki G. Gamma Oscillations in the Entorhinal Cortex of the Freely Behaving Rat. *The Journal of Neuroscience*. 1998;18(1):388-98.
277. Cunningham MO, Davies CH, Buhl EH, Kopell N, Whittington MA. Gamma Oscillations Induced by Kainate Receptor Activation in the Entorhinal Cortex In Vitro. *The Journal of Neuroscience*. 2003;23(30):9761-9.
278. Narayanan RT, Seidenbecher T, Kluge C, Bergado J, Stork O, Pape HC. Dissociated theta phase synchronization in amygdalohippocampal circuits during various stages of fear memory. *European Journal of Neuroscience*. 2007;25:1823-31.
279. Lorenz EN. Atmospheric Predictability as Revealed by Naturally Occurring Analogues. *J Atmos Sci*. 1969;26:636-46.

280. Le Van Quyen M, Foucher J, Lachaux J, Rodriguez E, Lutz A, Martinerie J, et al. Comparison of Hilbert transform and wavelet methods for the analysis of neuronal synchrony. *J Neurosci Methods*. 2001 Oct 30;111(2):83-98.

9. Apêndice

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/10/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0948/09**, intitulado: "**DINÂMICA E CONECTIVIDADE FUNCIONAL ENTRE O CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR E O HIPOCAMPO NA VIGÊNCIA DO RITMO TETA EM RATOS WISTAR**" apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Koichi Sameshima**

Pesquisador (a) Executante: **Ana Carolina Bione Kunicki**

CAPPesq, 08 de Outubro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

São Paulo, 14 de abril de 2008

Ilma. Dra. Ana Carolina Bione Kunicki

Pesquisadora Responsável

Prezado Pesquisador,

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital Sírio Libanês analisou e **APROVOU** o Projeto de Pesquisa CEUA 2008/04 "Dinâmica e conectividade funcional entre o córtex cingulado anterior e o hipocampo na vigência do ritmo teta em ratos wistar".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Francisco Humberto de Abreu Maffei
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Sociedade Beneficente Hospital Sírio Libanês