Andrea Yoon Choi

Caracterização dos efeitos da estimulação elétrica no núcleo basalis magnocelular no potencial de campo local e na frequência cardíaca no condicionamento comportamental de ratos Wistar.

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

**Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Koichi Sameshima**

Andrea Yoon Choi

**Caracterização dos efeitos da estimulação
elétrica no núcleo basalis magnocelular no
potencial de campo local e na frequência
cardíaca no condicionamento
comportamental de ratos Wistar.**

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

**Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Koichi Sameshima**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Yoon Choi, Andrea

Caracterização dos efeitos da estimulação elétrica no núcleo basalis magnocelular no potencial de campo local e na frequência cardíaca no condicionamento comportamental em ratos Wistar / Andrea Yoon Choi. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Koichi Sameshima.

Descritores: 1.Núcleo basal de Meynert 2.Acetilcolina 3.Córtex auditivo
4.Frequência cardíaca 5.Potencial evocado 6.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-434/07

Dedico esse trabalho àqueles que incansavelmente acreditam e trabalham para as ciências com a mesma seriedade que se brincava quando se era criança.

Agradecimentos

Agradeço a meus pais, Sang Mo Choi e Kye Myung Lee por me amar, apoiar e ter acreditado nos meus estudos. Aos meus irmãos, Jae, Adriana e Fernando por me apoiar da mesma forma e me incentivar cada um à sua maneira.

Agradeço os meus bons amigos, uns mais presentes que outros nas diferentes etapas e circunstâncias da vida, mas sempre ternos a cada reencontro: Arnaldo, Gabi, Cesário, Juliana Vicente, Angela, Sarinha, Fabinho, Lucas, Daniel, Rodrigo, Luiz, Irina, Rebecca, Gustavo, Sílvia, Beth, Juju Gregori, Bicca, Nato, Samu, Kris, Chen, Hsu Chen, Fábio, Jana, Indrani, Aninha, Alfred, Roberto, Marisa, Gary, Luciana e Márcia.

Agradeço ao auxílio cotidiano dos meus colegas Maria Carolina, Edgard, Milena, André, Carol, Julien, Eduardo, Andrea, Kleber, Marina, Flávia. Agradecimentos especiais ao Lucimar, Lucas e Renato por cuidarem e zelarem pelo bem estar dos animais que participaram desse projeto.

Ao meu orientador prof. Koichi por ter acreditado que o meu trabalho seria possível desde a germinação como projeto. E os meus agradecimentos especiais ao Daniel, Luiz e Cesário com sugestões e soluções criativas e robustas para me auxiliar nas horas críticas, sem as quais esse trabalho não teria finalizado.

Ao pessoal da pós graduação, Sônia, Tânia e profa. Maria Aparecida por me dar uma perspectiva inovadora da pedagogia.

E agradecimentos aos animais que se doaram, mesmo que sem consentimento, para a realização desse trabalho.

Outros agradecimentos especiais à profa. Sara Joyce Shamman Lagnado (ICB-USP) e a Aninha pelo empréstimo das alíquotas de ChAT para a imunohistoquímica do núcleo basalis magnocelular e além de tudo, pela receptividade e por dividirem o conhecimento e técnicas morfológicas de excelência.

Agradecimentos à Instituição Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao hospital Sírío Libanês - Instituto de Ensino e Pesquisa por possibilitarem a estrutura e insumos de pesquisa para que eu realizasse esse trabalho.

Em especial, à AASDAP (Associação Alberto Santos Dumont para Apoio à Pesquisa) por financiar a compra os materiais e equipamentos tão necessários para a realização desta tese.

À CAPES por conceder me a bolsa de pesquisa de doutorado para que eu pudesse dar prosseguimento aos meus estudos.

“Se Deus tivesse, na sua mão direita, a verdade toda e, na sua mão esquerda a infinita busca da verdade, sem nunca chegar a ela, e me dissesse: “Escolha!” Eu diria: “Dá-me a sua mão esquerda porque a verdade é para ti somente.”
(Lessing).

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver"
(Martin Luther King

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	20
3. MÉTODOS.....	21
4. RESULTADOS.....	36
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÕES.....	66
7. ANEXOS.....	67
8. REFERÊNCIAS.....	68

Resumo

Summary

Lista de abreviaturas

Introdução

Sistema colinérgico

A acetilcolina (ACh) foi a primeira molécula identificada a agir como neurotransmissor (Semba, 2004). Ela está envolvida em diversos processos e funções no sistema nervoso central que compõem a memória e o aprendizado (Kilgard e Merzenich, 1998; McLin et al., 2002b) a corticogênese, a excitabilidade neuronal (Metherate e Ashe, 1991), a modelagem dos campos receptivos, o controle de microcirculação neural (Hotta et al., 2002), as funções globais de vigília-sono (Szymusiak et al., 2000) e a atenção (McLin et al., 2002b), que, de modo geral, estão todos relacionados ao estado de ativação neocortical. A ACh também está em outros órgãos como na placenta, na placa motora de músculos esqueléticos ou nos broquíolos sem exercer a função de ativação neuronal *per se*.

O prosencéfalo basal colinérgico é o conjunto de neurônios no telencéfalo ventral que projeta para o córtex cerebral ou *pallidum*. Eles se distribuem rostrocaudalmente nos núcleos septo medial, banda diagonal de Broca (horizontal e vertical), *pallidum ventral*, área pré-óptica magnocelular, substância inominada e núcleo basal magnocelular ou *nucleus basalis magnocellularis* (NBM, nos primatas núcleo de Meynert). Dos núcleos do prosencéfalo basal, o Ch4 (Mesulam, 2004) é o mais proeminente em humanos, por totalizar aproximadamente 200 mil neurônios colinérgicos por hemisfério (Arendt e cols., 1985 *apud* (Semba, 2004), muito provavelmente acompanhando o grande desenvolvimento filogenético do neocórtex para o qual se projeta. Esse grupamento ainda contém maior quantidade de RNA mensageiro de enzima ChAT do que o septo, revelando uma maior expressão gênica para produção de acetilcolina (Semba, 2004).

Mesulam e cols. (1983) organizaram o sistema colinérgico central do rato em seis grupamentos, Ch1 a Ch6, guiados pela homologia da classificação feita nos primatas. O grupamento Ch1 é o conjunto de neurônios colinérgicos da região septo medial e juntamente com Ch2, neurônios colinérgicos do ramo vertical da banda diagonal de Broca, projetam-se para o hipocampo; já Ch3 é o grupo de neurônios colinérgicos presentes na região lateral do ramo horizontal da banda diagonal de

Broca que se projeta para o bulbo olfatório; Ch4 é o conjunto de neurônios colinérgicos que se espalham pelo NBM, globo pálido, substância inominada, lateral do ramo vertical da banda diagonal de Broca e parte medial do ramo horizontal da banda diagonal de Broca (inclusive a região do núcleo pré-óptico magnocelular) e projeta-se para o neocórtex e amígdala; Ch5, os neurônios colinérgicos do núcleo pedúnculo-pontino presentes dentro dos núcleos cuneiforme e da área parabraquial, projeta-se para o tálamo; e finalmente, Ch6, os neurônios colinérgicos do núcleo tegmental látero-dorsal também se projetam para o tálamo, sendo juntamente com Ch5 as maiores projeções colinérgicas do tálamo.

O prosencéfalo basal colinérgico de ratos, animais utilizados nesse estudo, é similar ao de outros roedores, como o porquinho-da-índia e o camundongo, porém menos complexo do que o dos mamíferos carnívoros, como o furão, o guaxinim e o cão, e esses menos diferenciados que o dos primatas (revisto por Semba, 2004). Apesar de faltar uma delimitação precisa dos grupos de neurônios colinérgicos no rato, o contrário do que se encontra nos primatas onde principalmente os grupos de Ch1 à Ch4 são relativamente bem delineados, Mesulam e cols. (1983) basearam-se nos critérios de conectividade, topografia e citoquímica entre as espécies para a divisão e classificação dos núcleos do prosencéfalo basal colinérgico ao considerar que evolutivamente esses animais não estariam tão distantes na escala filogenética (Mesulam et al., 1983).

O prosencéfalo basal é composto de células colinérgicas, GABAérgicas, glutamatérgicas e peptidérgicas, e recebe projeções de neurônios da formação reticular mesencefálica (Jones, 1995). Em primatas, o NBM recebe projeções na maioria glutamatérgicas e GABAérgicas, do sistema límbico e paralímbico, incluindo a amígdala. O NBM possui receptores para os neurotransmissores serotonina, dopamina e norepinefrina, mas suas células também respondem a ACh, neurotensina, substância P, L-glutamato e orexina. No rato, as projeções glutamatérgicas vindas do córtex cerebral terminam quase todas sobre os neurônios GABAérgicos do NBM. Ainda no rato, observou-se aferências provenientes dos neurônios tegmental ventral dopaminérgicos, neurônios serotoninérgicos da rafe e neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus.

A localização espacial do NBM

Os neurônios do grupamento Ch4 projetam em grande parte para os neurônios piramidais do neocórtex e do hipocampo (revisto em Butcher, 1995; Mesulam, 2004). Observou-se que Ch4 também emite projeções para neurônios não-piramidais (revisto em Mesulam, 2004). Em ratos, os neurônios colinérgicos são multipolares, com corpos celulares ovais ou fusiformes, relativamente grandes, medindo entre 18 a 43 μm , e possuem axônios longos.

Em primatas, o NBM pertencente ao prosencéfalo basal descreve o conjunto de neurônios de corpo celular grande que coram intensamente para acetilcolinesterase, enzima que catalisa a hidrólise de acetilcolina em acetil e colina, e está presente em neurônios ativados por ACh, na região da substância inominada identificados de forma clara e direta (Lehmann et al., 1980). No entanto, o NBM também contém neurônios não-colinérgicos, como os neurônios GABAérgicos presentes no núcleo e dessa forma o grupamento Ch4 é mais restritivo que o termo NBM (Mesulam, 2004). Nesse trabalho, o NBM abordado se refere àquele pertencente ao Ch4, o NBM de neurônios colinérgicos.

No entanto, no rato e no gato a homologia do NBM não se baseou apenas na localização, adjacente a estruturas estriatais onde a substância inominada recebeu o nome de *pallidum ventral*, mas em diversas características consideradas: a **topografia**, por ser um conjunto de neurônios que recebe aferências provenientes do núcleo acumbens e/ou do tubérculo olfatório e por projetar-se para o neocórtex, e a **morfologia** por também corar intensamente para acetilcolinesterase, por suas células apresentarem neurópilo idêntico ao do globo pálido, serem isodendríticas e medirem em torno de 25 - 45 μm cada (Lehmann et al., 1980). Comparativamente, as células colinérgicas do NBM são maiores do que as da área septal medial e do núcleo da banda diagonal de Broca, justificando a denominação de núcleo basal magnocelular atribuído devido a sua morfologia de neurônios gigantes e isodendríticos.

As projeções colinérgicas do NBM para o córtex são difusas. A maior densidade de terminações colinérgicas está nas camadas mais superficiais do córtex cerebral. Em ratos e gatos, observou-se que as fibras colinérgicas são quase todas não-mielinizadas, com muitas varicosidades, fazem sinapses simétricas, típicas de neurônios inibitórios, e assimétricas, típicas de neurônios excitatórios

glutamatérgicos, com neurônios piramidais e não-piramidais. Corrobora com o fato da inespecificidade das projeções colinérgicas do córtex cerebral o dado de que 1/3 das suas terminações sinápticas são identificadas como não-especializadas, ou seja, são terminações sem pós-sinapses visíveis o que faz supor que uma característica importante na transmissão colinérgica para o córtex seja o volume de neurotransmissor ou que a acetilcolina seria principalmente um modulador da atividade neuronal (Mesulam, 2004).

Os receptores muscarínicos e nicotínicos no neocórtex

Os receptores corticais para a ACh no neocórtex são do tipo muscarínicos e nicotínicos. Todos os receptores muscarínicos possuem proteína G acoplada (Mesulam, 2004), enquanto os receptores nicotínicos são canais iônicos (Yakel e Shao, 2004). Os receptores muscarínicos abrangem 5 subtipos, M1 a M5. Os estudos em humanos revelam que o receptor muscarínico do subtipo M1 é o mais comum no córtex cerebral, presente em quase todos os neurônios corticais e nas sinapses assimétricas típicas de neurônios que liberam aminoácidos excitatórios, o que leva a supor que a ACh cortical controlaria o **nível de excitação cortical**. O subtipo M2 encontra-se no neurópilo e no pericário de neurônios colinérgicos e em terminais de neurônios não-colinérgicos, sugerindo que nesse tipo de receptor a ACh tenha função de controle de **liberação de neurotransmissores**. O subtipo M3 está presente no prosencéfalo, camadas piramidais do hipocampo, córtex entorrinal e camadas superficiais do córtex cerebral no corpo celular dos neurônios e nas pós-sinapses. O subtipo M4 aparece no neurópilo mas associado a M1 e M2 em menores densidades. O subtipo M5 tem sido pouco observado no córtex. Já os receptores nicotínicos possuem 11 subtipos, sendo nove deles descritos no sistema nervoso do rato adulto ($\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\beta 2$ - $\beta 4$) e presentes em pré e pós- sinapses e acredita-se que eles contribuam na sincronização por ativação de interneurônios inibitórios e neurônios excitatórios do hipocampo. As fibras colinérgicas corticais inervam neurônios glutamatérgicos por meio de receptores muscarínicos ou nicotínicos, interneurônios GABAérgicos e neurônios infracorticais NADPH-positivos (Yakel e Shao, 2004).

A inervação do NBM para o córtex auditivo primário (ACh)

Com o auxílio da enzima colina acetil-transferase (ChAT), enzima promotora da síntese da acetilcolina e preferível à enzima acetilcolinesterase por marcar especificamente os neurônios colinérgicos, Lehmann e cols. (1980) realizaram experimentos com lesões por degeneração retrógrada do NBM em ratos por administração de ácido caínico no neocórtex associada a imuno-histoquímica dessa enzima e verificaram que houve redução apenas de neurônios colinérgicos na extremidade caudal ventro-medial do globo pálido, região considerada homóloga à substância inominada de primatas, demonstrando a projeção desses neurônios colinérgicos para as regiões corticais. Ainda, lesões por ácido ibotênico no NBM reduziram entre 15 e 45% a quantidade de ChAT no córtex frontal lateral ao córtex cingulado, dorsal cingulado, córtex parietal e parietal lateral do rato (Wenk et al., 1984).

Quanto a lateralidade das projeções do NBM, Lehmann e cols. (1980) observaram que, ao promover a ablação unilateral do neocórtex na região anterior ao bregma e medir a atividade das enzimas acetilcolinesterase e ChAT, as projeções do NBM seriam principalmente ipsilaterais por haver quedas significativas da atividade dessas enzimas. Sendo em 19,4% para a acetilcolinesterase e em 35,9% para ChAT, enzima mais específica dos neurônios colinérgicos, em relação ao hemisfério contralateral intacto do rato. A recíproca se provou verdadeira quando eles realizaram lesão eletrolítica ou por ácido caínico do NBM com posterior medição da atividade dessas enzimas sintetizadora e metabolizadora da ACh que do mesmo modo, apresentaram queda em torno de 23% para ambas. Ainda, as hemitransecções no nível caudal do núcleo entopeduncular não alteraram a quantificação para essas enzimas em relação aos animais controles, comprovando que as depleções significativas ocorreram devido a lesões restritas aos núcleos da região do globo pálido.

Moriizumi e Hattori (1992) estudaram as projeções do globo pálido injetando os traçadores retrógrados Fluorogold e “*propidium iodide*” respectivamente no córtex auditivo primário e no núcleo pedúnculo-pontino na região do tegumento mesencefálico caudal e associando-os à imuno-histoquímica para ChAT. Esses autores observaram a existência de uma grande população de neurônios colinérgicos

no terço caudal do globo pálido. No entanto, essas duas projeções não se sobrepunham uma a outra, sendo os neurônios da projeção do globo pálido-córtex auditivo primário localizada ventro-medialmente, com neurônios medindo entre 20 e 35 μm , e os neurônios da projeção globo pálido — núcleo pedúnculo pontino localizados mais dorso-lateralmente medindo de 15 à 25 μm . Além disso, os autores relatam também uma pequena população de neurônios não-colinérgicos no globo pálido rostral que se projeta para os córtices frontal e pré-frontal (Moriizumi e Hattori, 1992). Apesar dessas evidências, alguns pesquisadores ainda supõem que neurônios da região da formação reticular do tronco encefálico projetam-se para essa região (Jones, 1995; Metharate et al., 1992). Isso poderia ocorrer devido a variações nos procedimentos imuno-histoquímicos, como devido ao uso de fatias de tecido mais espessas (maiores que 10 μm) que poderiam interferir na absorção de anticorpos e assim impedir a coloração de todas as células (Gritti et al., 2006).

O EEG reflete o estado de ativação cerebral (vigília ou sono)

Duas vias de ativação cortical: via direta por Ch4-córtex e via indireta por Ch5-Ch6 e pelo tálamo-córtex (Sistema de Ativação Reticular Ascendente ou SARA). O psiquiatra Hans Berger inventou o primeiro aparelho de eletroencefalograma (EEG) em 1920 que permitiu a observação da atividade elétrica cerebral no escalpo (Saper, 2000). Os padrões característicos de ondas elétricas oriundas do córtex puderam ser associados aos estados de alerta do indivíduo, cujas ondas eram de baixa voltagem e frequências acima de 12 Hz, e ao sono profundo do indivíduo, cujas ondas eram de alta voltagem e frequências abaixo de 3 Hz. Desde então, o padrão de ondas de frequências rápidas de baixa de voltagem ou simplesmente denominado de **ondas rápidas** ou **ativação cortical** (ondas de baixa amplitude e de alta frequência_ vide Figura 1a) foi relacionado ao **estado de alerta** e ao de **sono REM** (*rapid eye movement*, sono dessincronizado ou paradoxal), em que ocorrem movimentos oculares e atonia muscular, ou como alguns autores preferem

Figura 1. (a) Exemplo de um trecho de vigília em rato com teta e gama, 100 $\mu\text{V/s}$; e (Abásolo et al.) de um trecho de eletrocardiograma de rato, 1 s, ambos dados próprios. Em (c), exemplo de plasticidade no mapa cortical auditivo primário em ratos antes do treino e em (d), após o treino de estimulação elétrica do NBM associada ao som de 19 kHz (figuras retiradas do artigo de Puckett e cols., 2007)

denominar, **dessincronização** ou **sono paradoxal**, esse último devido ao seu padrão de ondas ser muito semelhante ao da vigília, porém, sendo um estágio do sono. Enquanto o padrão de ondas de frequência abaixo de 3 Hz de alta voltagem, presente nos estados de **sono de ondas-lentas** ou **sincronização**, é o mais dominante nas diferentes fases do sono do indivíduo (Saper, 2000).

Em 1935, o neurofisiologista Frederic Bremer, realizou um experimento que se tornaria clássico. Isolou o encéfalo de gato das aferências sensoriais provenientes da medula espinhal seccionando abaixo do nível do tronco cerebral, o que permitia o

animal ainda responder aos estímulos auditivos e visuais, e movimentar os olhos e face, além de apresentar EEG cortical típico de ativação de vigília (*apud* Saper, 2000 e Steriade, 2001). No entanto, ao isolar o encéfalo ao nível intercolicular, um pouco mais rostral, anterior à primeira secção, entre os colículos inferiores e superiores, Bremer observou que o gato parava de responder a qualquer estímulo extrasensorial, parecendo estar em um estado comatoso e seu EEG era caracterizado por ondas lentas (Saper, 2000). Esse experimento sugeriu fortemente que o **núcleo reticular mesencefálico**, presente nesse intervalo de apenas 1,7 mm de espessura que separava dois tipos tão distintos de comportamentos, poderia ser o centro regulador do alerta. No entanto, outros pesquisadores (Batsel, 1964; Villablanca, 1965; *apud* Steriade, 2001) realizando o mesmo experimento observaram que, se esse animal experimental fosse preservado por um período de 10 à 20 dias após a transecção mesencefálica, ele poderia readquirir a expressão de EEG semelhante ao da vigília e apresentar uma miose menos marcante; e, se, então, fosse mantido pelo período crônico de 300 dias após a transecção intercolicular, o gato poderia recuperar a expressão de EEG bem característica da vigília (Moruzzi, 1964 *apud* Steriade, 2001).

O experimento de Bremer foi apenas o início para o surgimento da idéia de que existiriam outros centros geradores de ritmos que comandariam a atividade elétrica de outros núcleos cerebrais e conduziriam a atividade de vigília e de sono ou do tônus de alerta no indivíduo. Steriade (2001) propôs os seguintes critérios de definição dos centros de vigília ou sono, mas que poderiam ser aplicados a quaisquer outros centros cerebrais com funções similares. Seriam eles: “a) os centros devem ser constituídos de neurônios homogêneos e quimicamente codificados com neurotransmissores específicos, estrategicamente localizados no centro de muitos canais sensoriais e capazes de direcionar vários neurônios efetores; b) a ativação natural ou artificial do centro deve aumentar a incidência de um certo comportamento e/ou a atividade elétrica relacionada, e a sua destruição o efeito oposto; c) o isolamento do centro deve prejudicar os processos que supostamente ativam as suas estruturas-alvo, mas não deve interferir na atividade espontânea resultante das interações neuronais dentro do próprio núcleo; d) quando gravações celulares são adquiridas desses centros hipotéticos, seus neurônios constituintes devem ser fisiologicamente identificados por meio de invasão antidrômica assim

como as projeções das estruturas implicadas na execução de determinada função e as atividades espontâneas dos neurônios do centro devem exibir sinais de aumento/diminuição estatisticamente significativo(a) na frequência de disparos antes do tempo “zero” do início do dado processo neural ou estado comportamental”.

O prosencéfalo basal, segundo Barbara Jones (2004), poderia funcionar como um relê extra-talâmico, além da via direta talâmica do SARA vindo do tronco cerebral em direção ao córtex cerebral que também contribui para o alerta do indivíduo (Saper, 2000). Estabelecendo a conexão entre a formação reticular do tronco e os córtices cerebrais por receber as projeções do primeiro e por projetar vastamente para o segundo (Jones, 1995; Metherate et al., 1992), sabe-se que a sua estimulação elétrica ou química provoca a ativação cortical (Edeline et al., 1994; McLin et al., 2002a; McLin et al., 2002b; Metherate e Ashe, 1991; Metherate et al., 1992). Assim, existiriam duas vias de ativação cortical, uma direta, mediada por Ch4 que inerva diretamente o córtex cerebral, e outra indireta, de Ch5 e Ch6 innervando a via tálamo-cortical (Saper, 2000).

Estudos fisiológicos da lesão e estimulação do NBM

As lesões bilaterais com ácido cáinico em gatos na região do prosencéfalo basal incluindo o grupo Ch4, no qual se inclui o NBM, provocaram mudanças nos padrões de EEG da vigília e do sono de gato (Szymusiak e McGinty, 1986) e também foram observados em pacientes com doença de Alzheimer. O padrão de sono após as micro-injeções de ácido cáinico, substância que lesiona células, mas preserva as fibras de passagem, tornou-se mais fragmentado (mudanças de estágios de sono) e com redução significativa da quantidade dos episódios de sono de ondas lentas e REM, mas com o aumento da vigília em 2,15 vezes em relação ao controle uma semana após a lesão. No entanto, os padrões de fragmentação do ciclo sono-vigília retornaram aos níveis próximos ao normal, porém ainda significantemente reduzidas após 6-7 semanas de lesão e com a relativa ausência de trens fusos de alta frequência, componente cuja geração tem influência do prosencéfalo basal. Os autores ainda reportaram que lesões causadas na região da substância inominada caudal-lateral provocam maior prejuízo no ciclo de sono que na substância inominada rostral.

O sistema colinérgico está correlacionado à ativação cortical e aos comportamentos de atenção e sono REM. A administração de agonistas colinérgicos resulta em ativação cortical (Fisahn, 1998) e que pelo contrário, o uso de antagonista colinérgico muscarínico administrados tanto de forma sistêmica quanto local, em fatias ou in vivo promovem sincronização do córtex reduzindo a dessincronização cortical (Metherate e Ashe, 1991; Metherate et al., 1992), o que apenas demonstra que a natureza da ativação cortical é muscarínica ou pelo menos modulada pelo neurotransmissor ACh.

Para melhor averiguar a hipótese de o prosencéfalo basal colinérgico ser um dos moduladores da atividade cortical e gerador dos diferentes estados comportamentais, foi necessário caracterizar a atividade de disparos dos diversos tipos neuronais dessa região e correlacioná-la à atividade elétrica do córtex cerebral. Assim, Lee e cols. (2004) caracterizaram o comportamento de disparo de 123 neurônios do prosencéfalo basal em ratos acordados por meio de técnica de gravação com eletrodos de micropipetas e posterior identificação justacelular com biotina de cada neurônio gravado. Viram que a **grande maioria desses neurônios, cerca de 62%, disparavam maximamente nos estados de sono paradoxal, durante a vigília e emissão de comportamentos pelo animal e tinham correlação positiva com o aparecimento das ondas teta e gama.** Além disso, observaram que 12% dos neurônios registrados tiveram maior número de disparos nos estados acordado e de atividade motora e correlacionavam-se positivamente com a atividade gama e que outros **16% correlacionavam-se negativamente com a atividade motora, mas positivamente com a atividade delta.** Com esses dados, eles sugeriram que os neurônios do prosencéfalo basal poderiam potencialmente ser o centro regulador (ou modulador) da ativação comportamental e do sono. Mais tarde, esse mesmo grupo de pesquisadores (Lee et al., 2005) diferenciaram os neurônios do prosencéfalo basal com técnica de imuno-histoquímica para ChAT com marcação neuronal individual por biotina e observaram que eram os neurônios colinérgicos que **disparavam maximamente em trens rítmicos e com forte correlação com as frequências teta e gama nos estados de vigília, transição de vigília para sono REM, sono REM, e ainda se apresentavam silentes durante o sono de ondas-lentas e possuíam correlação negativa com a frequência delta.** Adicionalmente, observaram que os

neurônios não-colinérgicos do prosencéfalo basal, apesar de correlacionados ao conjunto de células do prosencéfalo basal que mais dispararam durante a vigília, foram eles a apresentar maior atividade de disparos durante o sono de ondas-lentas e a se correlacionar positivamente com a frequência delta (Lee et al., 2005).

A estimulação elétrica do NBM e a plasticidade cortical

Observando a plasticidade das frequências características determinadas pelos disparos dos neurônios corticais, Bakin e Weinberger (Bakin e Weinberger, 1996a) realizaram um experimento em que associaram temporalmente a **estimulação elétrica** do núcleo entopeduncular ou globo pálido interno/ substância inominada a um **som puro** diferente da melhor frequência característica dos neurônios registrados do córtex auditivo primário. A região do núcleo entopeduncular próxima a substância inominada foi escolhida pois diversos estudos neuroanatômicos que injetaram traçadores retrógrados nessa área e utilizaram marcadores de ACh demonstraram que a presença de neurônios colinérgicos do NBM e que esses projetam para o córtex auditivo primário no rato. Após várias repetições da associação desses dois estímulos, os pesquisadores observaram que os neurônios registrados mudavam de sintonia, ou seja, modificavam sua frequência característica, o que caracterizou uma plasticidade neuronal devido à mudança de uma característica neurofisiológica que viram ser consistente e de longa duração (durou 20 minutos após a associação).

Desse modo, Bakin e Weinberger (1996) demonstraram que as estimulações elétricas de correntes médias de 270 μ A no NBM concomitantes a determinados estímulos sensoriais eram suficientes para provocar alterações nas características representativas dos disparos das células do córtex auditivo primário. O mesmo estudo também confirmou que a atividade de dessincronização cortical em ratos anestesiados com pentobarbital era dependente de ACh pois a aplicação de antagonista colinérgico, atropina, ou localmente ou sistemicamente impediu a ativação cortical. Esses dados corroboraram com os achados neuroanatômicos e vieram implementar os dados eletrofisiológicos porque além de o NBM projetar para o todo o córtex cerebral, poderia modular a atividade de disparo dos neurônios do córtex cerebral por meio de suas aferências colinérgicas.

As estimulações químicas no NBM por meio de administração de glutamato por iontoforese também resultaram em ativação do neocórtex e contrariamente, as

aplicações de atropina local (Metherate et al., 1992), ou sistemicamente (Metherate e Ashe, 1991), antagonizaram essa ativação do córtex, o que demonstra a natureza química colinérgica da ativação cortical do NBM (Bakin e Weinberger, 1996a; Metherate e Ashe, 1991). Deste modo, a estimulação elétrica e estimulação por glutamato da região do NBM geram dessincronização cortical semelhante.

Interessantemente, Metherate e Ashe (1991) demonstraram em ratos que a forma de se estimular eletricamente o NBM poderia modular características do potencial evocado em amplitude, forma da onda dos disparos e intervalo interestímulo que partem do NBM ou do tálamo; ou seja, facilitar a sua detecção pelo córtex cerebral ou não. O potencial evocado é um estímulo sensorial que sai da periferia do corpo do indivíduo e chega o córtex cerebral sensorial. Em seus experimentos, os estímulos eram gerados no núcleo geniculado talâmico e alcançavam o córtex auditivo. Se o NBM fosse estimulado na forma de trem rítmicos (200 Hz; 500 ms de duração e 500 μ A) o estímulo talâmico seria aumentado em amplitude em até 246% e sua duração poderia chegar a 95% em relação ao estímulo original talâmico. Por outro lado, se o NBM fosse estimulado por pulsos únicos (1-3 pulsos; 0,1ms de duração e 200-500 μ A de corrente contínua), o estímulo talâmico chegaria ao córtex reduzido em até 49% de amplitude e com duração reduzida em até 128%. Eles observaram também que a atropina administrada sistemicamente antagonizava a facilitação do NBM às respostas de potencial evocado tálamo-corticais porém, ainda assim com a presença desse agonista, essa facilitação produziu um aumento de 151% na amplitude de resposta cortical (Metherate, 1991).

Edeline e cols. (1994) realizaram um experimento em que testaram se a **liberação de ACh por estimulação elétrica do NBM** (variou de 112 ± 40 uA) **facilitaria a resposta neuronal no córtex auditivo à entrada de um som** (variou de 6-10 kHz, 50-70 dB) durante o **sono de ondas lentas** ou na **vigília**. Após o treino de algumas dezenas de pareamento dos estímulos elétrico no NBM e sonoros nos estados de sono de ondas lentas, vigília normal e com vigília atropina, observaram que houve um aumento de disparo neuronal do córtex auditivo após a estimulação elétrica do NBM no lado ipsilateral mas não no lado contralateral evidente no sono de ondas lentas e na vigília apenas **após o treino com a eliciação do som**. O uso de atropina sistêmico, mais uma vez aboliu o efeito facilitação da ACh, indicando

novamente que o efeito da estimulação do NBM é intermediado por ativação de receptores muscarínicos.

Condicionamento e plasticidade cortical

O condicionamento tem sido uma forma de abordagem experimental simples e bem interessante para o estudo da aprendizagem e memória, pois abrange poucas variáveis e, portanto, auxilia a estabelecer relações de causa e efeito mais específicas. O seu princípio consiste em associar temporalmente dois estímulos, um que elicie naturalmente no sujeito uma resposta comportamental, o chamado estímulo não-condicionante (US_ unconditioned stimulus), e o outro que seja um estímulo neutro, o estímulo condicionante (CS_ conditioned stimulus) que se apresentado sozinho, dificilmente eliciaria a mesma resposta comportamental. Desta forma, após certa quantidade de repetições dessa associação de estímulos, o CS sozinho seria capaz de induzir a resposta comportamental no animal treinado (Catania, 1992).

A estimulação elétrica do NBM dos ratos em esquiva ativa de duas vias (Montero-Pastor et al., 2004); com trem de pulsos de 500 ms de duração, à 100 Hz, ondas quadradas 0,5 ms cada; tempo de estimulação de 20 min e corrente de 60 - 90 uA) imediatamente antes (aquisição), imediatamente depois (retenção), e 24 h após o treino (revocação), provocou efeito significativo na aquisição da tarefa aumentando a média de esquivas em 218% do animal em relação ao controle, mas o mesmo efeito não foi observado na retenção nem na revocação, o que leva a supor a ACh tem um importante efeito na atenção para os estímulos, mas talvez não tanto para a consolidação da informação.

Em experimentos de condicionamento instrumental, ou condicionamento operante, Bakin e cols., (Bakin et al., 1996b) treinaram porquinhos-da-índia a girar uma roda de atividade toda vez que ouviam um som (CS: 10 kHz, 6s) que enunciava um seguido choque nas patas (US: 200 Hz, 1-10mA, 2s). As medições de campo receptivos de neurônios do córtex auditivo primário desses animais antes e depois ao aprendizado aversivo, com 70% de acerto da tarefa, indicaram que houve uma plasticidade do campo receptivo em direção ao CS, ou seja, um aumento de disparos para o CS. E quando um outro som era adicionado ao condicionamento aversivo que não sinalizasse a vinda de choque nas patas do animal, os autores constataram que

não havia qualquer mudança na plasticidade neuronal, concluindo que a **plasticidade de campos receptivos** no córtex auditivo primário induzida por condicionamento instrumental aversivo era **frequência específica** e além disso **duradoura**, por durar significativamente mais de 24 horas após a aquisição.

O córtex auditivo primário ou também conhecido como A1 ou área 41 e 42 de Brodmann é uma região que possui a representação tonotópica para as frequência sonoras. No rato albino, essa área encontra-se no lobo temporal do cérebro e possui células com frequências características similares organizadas de modo que as frequências mais altas localizam-se rostralmente e as mais baixas por sua vez localizam-se mais caudalmente. O mapa do córtex auditivo primário é desenhado a partir de frequências características de conjunto de neurônios de pequenas áreas determinadas por eletrodos inseridos no córtex sensorial que captam os disparos dos potenciais de ação. A frequência característica de um neurônio do córtex auditivo primário é o ponto mais baixo da curva de sintonia com forma de “V”, um gráfico da resposta de disparos do neurônio a níveis mínimos de pressão em decibéis pela frequência sonora (Bakin et al., 1996b). A alteração da curva de sintonia dos neurônios corticais dos mapas sensoriais por aprendizagem é um dado atual e foi considerado surpreendente por desconhecer-se até então que células tão especializadas e filogeneticamente recentes poderiam desenvolver uma plasticidade fisiológica mesmo nos animais adultos.

Segundo Weinberger (2007), o córtex auditivo primário produz uma memória fisiológica: 1) indutível pelo aprendizado de novas experiências; 2) associativa; 3) específica; 4) de rápida aquisição, adquirida após 5-10 repetições em condicionamento ao medo, por exemplo; 5) de longa duração (por pelo menos 8 semanas) e 6) robusta o bastante para ser induzida até em animais anestesiados.

Kilgard e Merzenich (1998) realizaram um experimento a estimulação elétrica do NBM associada repetidamente por vários dias a uma determinada frequência sonora poderia produzir o mesmo efeito do US e supostamente, substituí-lo ao provocar **plasticidade dos campos receptivos no córtex semelhante a dos experimentos de condicionamento** (Bakin, 1996a). Após 20-25 dias de 300-500 pareamentos da estimulações elétrica do NBM (200 ms, 70-150 uA de corrente e 100 Hz, pulsos bifásicos) e a sonora (250 ms) as representações das frequências sonoras

no córtex auditivo primário do rato e verificaram que elas haviam se modificado em direção à frequência pareada.

A potência espectral, decomposição do sinal de EEG que permite quantificar a contribuição de cada frequência para formar uma onda complexa e expressa em μV^2 , permitiu observar que após a **estimulação elétrica do NBM**, houve um **aumento de frequências mais rápidas que 5Hz e diminuição das frequências de 1-5 Hz** (Metherate e cols., 1992). Diversos pesquisadores estimularam a região que abrange o globo pálido interno, substância inominada e globo pálido externo (Bakin e Weinberger, 1996a; Kilgard e Merzenich, 1998; McLin et al., 2002a; McLin et al., 2002b) onde espalham-se neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal que projetam para córtex auditivo (Moriizumi e Hattori, 1992). O resultado dessa estimulação no NBM foi a **ativação cortical** (Bakin e Weinberger, 1996a) e a **plasticidade do mapa auditivo primário**, com aumento de resposta neuronal ao som associado à estimulação do NBM (Kilgard e Merzenich, 1998). No entanto, esses estudos haviam sido realizados apenas em ratos anestesiados.

Em 2002, (McLin et al., 2002b), McLin III e cols. observaram que a estimulação elétrica do NBM em ratos que se comportavam livremente provocava alterações significativas nas atividades eletroencefalográficas, frequência cardíaca e respiratória. Observaram que havia um aumento espectral da potência da frequência gama (32,6 - 59,6 Hz) e beta (15 - 32,5 Hz) em relação ao espectro pré-estímulo, uma variação bifásica da frequência cardíaca com bradi seguida de taquicardia e um aumento na variação da frequência respiratória. Ainda viram que a magnitude da resposta de ativação cortical devido a estimulação do NBM não se alterou ao longo das várias sessões de treinamento, ou seja, não foi passível de habituação comprovando que a estimulação no NBM não é um estímulo sensorial, mesmo porque o NBM não pertence a qualquer sistema sensorial, mas age diretamente na modulação da entrada sensorial no córtex (McLin et al., 2002b).

A plasticidade dos mapas corticais também é um evento observado em experimentos em que havia a detecção de um determinado estímulo sensorial era necessário para que o animal obtivesse o reforço. Como em experimentos que mediram a plasticidade neuronal por meio do aumento de disparos dos neurônios dentro dos mapas sensoriais no córtex. Muitos deles utilizaram o condicionamento

clássico aversivo e associaram o estímulo condicionante ou US do tipo aversivo, um choque nas patas de um rato, ao estímulo condicionante ou CS, certa frequência sonora, e verificaram que após vários pareamentos, ocorria um aumento da área de representação daquela frequência auditiva no córtex auditivo primário dos ratos treinados (Detari e Vanderwolf, 1987), ou seja, o número de disparos para o som aversivo aumentou ou nas células representadas no mapa auditivo sugerindo que esse aprendizado específico promoveu uma modificação plástica do mapa cortical auditivo primário que reforçou o estímulo condicionante.

Vários experimentos sustentam a hipótese de que a expansão representativa de um determinado conjunto de aferências sensoriais nos mapas sensoriais do córtex seja uma medida indireta do aprendizado de um comportamento, uma vez que essas representam a entrada sensorial periférica engajada na tarefa. Em um deles, macacos foram treinados a utilizarem as pontas dos dedos a fim de reconhecerem uma superfície texturizada demonstrou-se que após treinamento prolongado a área de representação das pontas desses dedos no macaco se expandiu várias vezes do seu tamanho inicial (Buonomano e Merzenich, 1998; Catania, 1992p; Moucha e Kilgard, 2006). Esses resultados corroboram com a forte hipótese de que a modificação da representação nos mapas sensoriais primários no córtex seria parte ou a própria codificação da relevância de um estímulo sensorial específico quando ele está associado a uma importante contingência, ou seja, o fruto da experiência do sujeito.

A administração de anti-colinesterásicos no córtex sensorial produz a plasticidade de campos-receptivos semelhantes ao da estimulação do NBM. A ACh parece modular a plasticidade neuronal dos neurônios sensoriais, por isso está intrinsecamente relacionada ao processo de reorganização dos mapas sensoriais corticais. A estimulação elétrica do NBM associada ao tom de 6 kHz produziu uma modificação do mapa do córtex auditivo primário semelhante àquela produzida pelo condicionamento clássico aversivo Detari (1987), Kilgard e Merzenich (1998) observaram a reorganização progressiva dos campos receptores em direção ao tom de 6 kHz no mapa tonotópico em córtex auditivo primário de ratos adultos quando se pareava um tom de 6 kHz à estimulação elétrica do NBM. Desde então, especulou-se que a estimulação elétrica no NBM poderia substituir o reforçamento eliciado pelo US, e.g. água, comida ou choque nas patas do animal; ao induzir semelhante

plasticidade dos campos receptores das áreas corticais sensoriais decorrente de um condicionamento clássico (Jenkins e Merzenich, 1990; Kilgard e Merzenich, 1998; Miasnikov et al., 2001). Esse argumento sustenta a hipótese de que a ativação do NBM favoreceria a reorganização cortical, ou seja, a plasticidade cortical, e permitiria, desse modo, a sinalização do significado aprendido para o estímulo condicionado resultante do processo de condicionamento clássico (Brown, 1999). Sabe-se que essa mudança nos mapas sensoriais corticais seria dependente da ação da ACh no neocórtex. O bloqueio colinérgico local por atropina impediu a ocorrência da plasticidade dos campos receptores no córtex auditivo no condicionamento clássico com a estimulação elétrica do NBM como US (Kilgard e Merzenich, 1998).

No entanto, a modificação dos campos receptores nos mapas corticais sensoriais primários ainda não se correlacionava de forma direta à aprendizagem comportamental dos sujeitos. Foi então que surgiram resultados mais robustos e interessantes, relacionando a plasticidade dos mapas corticais, estimulação do NBM e aprendizagem comportamental. Miasnikov e cols. (2001) estudaram os efeitos da estimulação elétrica do NBM como US num esquema de condicionamento clássico, observando as respostas eliciadas pelo sistema vegetativo de ratos em vigília e descobriram que, após um certo número de pareamentos entre os estímulos elétrico no NBM e um sonoro específico (CS), esses produziram significativas mudanças bifásicas no ritmo de batimento cardíaco e interrupção nos padrões do ritmo de respiração apenas no grupo de animais experimentais e que essas respostas comportamentais eram passíveis de condicionamento, isto é, ocorreram também diante da apresentação apenas do CS. A vantagem dessa metodologia foi a de permitir uma avaliação do condicionamento do comportamento de “ouvir” do sujeito experimental. A reprodutibilidade dessas evidências mostrou que as respostas vegetativas são parâmetros confiáveis para se medir a aprendizagem, além de corroborar com a idéia de que o NBM é, de fato, uma estrutura importante também no processo de condicionamento clássico.

Relata-se que pacientes com doença de Alzheimer usualmente apresentam **prejuízo da ativação cortical** em relação aos pacientes sadios (Abásolo et al., 2006; Kramer et al., 2007), sendo essa neuropatia correlacionada a morte de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal. A administração sistêmica de tacrina em ratos,

uma droga anticolinesterásica de ação central e de uso em pacientes com Alzheimer, gera dessincronização cortical e abole o efeito sincronizador de drogas anticolinérgicas como a escopolamina (Dringenberg et al., 2002).

Para Romanski e Ledoux (1992) a decorticação da área auditiva primária não previne a ocorrência do condicionamento clássico. No entanto, estudos de Ohl e colaboradores (Ohl et al., 1999) demonstraram que apesar de a perda do córtex auditivo primário não ter afetado a aquisição de condicionamento acústico aversivo em tarefa go/no-go, animais que sofreram essa ablação bilateralmente apresentaram um déficit na discriminação entre dois conjuntos de tons complexos, como frequências crescentes ou decrescentes, generalizando-os e tendo uma queda em desempenho em relação aos animais controles. Isso indicaria que o processamento das características do som ocorreria paralelamente tanto no tálamo e quanto no córtex auditivo primário, porém nesse último em um nível mais complexo por anatomicamente obter acesso a uma maior quantidade de informações vindas dos outros córtices do que as regiões subcorticais como amígdala e tálamos também envolvidos nesse tipo de condicionamento.

Aprendizado comportamental

A plasticidade do córtex auditivo primário vem acompanhada de mudanças no padrão vegetativo, tais como frequência cardíaca ou respiratória, diâmetro pupilar e condutância da pele (Bakin e Weinberger, 1990; McLin et al., 2002b).

Aumento da representação cortical associada ao som condicionado e mudanças no padrão de respostas vegetativas ocorrem em animais condicionados mas não em animais não-condicionados. Em experimentos com porquinhos-da-índia, as curvas de sintonia de neurônios, que indicam o número de disparos, do córtex auditivo primário deslocaram-se para a frequência sonora condicionada depois de apenas 30 a 45 pareamentos do som ao choque. Isso ocorreu mesmo quando essas curvas eram complexas (com dois picos, por exemplo) ou não existentes. E, além disso, houve mudança no padrão de resposta da frequência cardíaca apenas nos animais condicionados.

A idéia de que a plasticidade cortical seja um bom modelo de medição de armazenamento do aprendizado induzido no córtex cerebral parece interessante por

ela ser associativa, i.e. requerer a associação temporal entre estímulos; altamente específica para a frequência condicionada, rápida de ser adquirida, duradoura e vir associada de respostas comportamentais vegetativas (Weinberger, 1998; Weinberger, 2007).

Objetivos

O objetivo desse estudo é verificar se a plasticidade cortical auditiva induzida por estimulações elétricas do NBM é acompanhada de alterações das respostas eletrofisiológicas quantificáveis das áreas cerebrais relacionadas (NBM e A1), e se há uma relação entre essa medida e a magnitude das respostas autonômicas representadas pelos batimentos cardíacos (sabidamente alterados pelo protocolo).

- Verificar se os efeitos descritos na literatura são reprodutíveis (alterações dos potenciais de campo e das frequências cardíacas) sob condições experimentais menos restritas que as apresentadas na literatura.
- Estudar a coerência entre estruturas neurais relevantes e obter mais detalhes sobre a variação dos espectros (desenvolvimento temporal).
- Testar se a aprendizagem comportamental medida por meio da frequência cardíaca é um processo específico, apenas para o tom apresentado no treinamento

Métodos

Sujeitos experimentais

Utilizou-se para presente estudo nove ratos adultos machos Wistar que pesavam 300-500g no início desse protocolo. Eles foram mantidos com seu ciclo claro-escuro das 7h00 às 19h00, alimentação e água ad-libitum. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e o protocolo experimental dessa tese foi aprovado pela comissão de ética da mesma instituição.

O protocolo de pesquisa deste trabalho foi aprovado pela CAPPesq (Comissão de ética para Análise de Projetos de Pesquisa) do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Implante de eletrodos

Os ratos receberam implante crônico de microeletrodos para registro eletroscilográfico antes de iniciar a fase de treinamento comportamental do protocolo de condicionamento aos estímulos elétrico do NBM e sonoro de 6 kHz. Na cirurgia de implante, os ratos foram anestesiados inicialmente com halotano (5%, com veículo O₂) por via aérea, xilazina (4 mg/kg) e cloridrato de cetamina (150 mg/kg) por via intramuscular ou thiopental (25 mg/kg) por via intravenosa. O nível de cloridrato de cetamina ou thiopental foi mantido estável com doses suplementares de 20% da dose inicial a cada hora aproximadamente. Os eletrodos foram implantados através de orifícios feitos na calota craniana com auxílio de equipo odontológico. Os orifícios variaram de 1 a 1,5 mm, em posições determinadas por coordenadas estereotáticas (Paxinos e Watson, 2005). Os microeletrodos bipolares (300 um de diâmetro) confeccionados com fio de níquel-cromo de 150 um de diâmetro para os eletrodos corticais e de 200 um para os eletrodos subcorticais ambos isolados por teflon. As áreas registradas apenas unilateralmente no hemisfério esquerdo a área auditiva primária A1b, Ap: -6,6mm; L: 7,4mm; H: 4,2mm), e área motora primária (M1, Ap: 2,0; L: 3,0) (Paxinos 5ª ed) e no NBM (Ap: -2,3 mm; L: 3,3 mm; H: 7,0 mm; Kilgard e Merzenich, 1998). Um eletrodo bipolar de impedância média de

100 k Ω foi inserido no NBM do hemisfério direito do sujeito (ângulo de 45° em relação ao crânio, inserido no hemisfério direito e direcionado ao hemisfério esquerdo (Ap: -2,3 mm; L: 4,2 mm; H*: 10,0 – 12,1 mm; (McLin, 2002b #229}). Quando esse eletrodo foi inserido no cérebro do animal 8,0 mm do seu comprimento; *estimulou-se seus pólos com um aparelho estimulador elétrico confeccionado para o experimento que emitiu os pulsos bipolares de 0,4 ms de duração cada, à frequência de 100 Hz e corrente média de 90 μ A. Esse eletrodo foi abaixado manualmente à passos de 200 μ m por meio da torre estereotáxica até que a sua estimulação elétrica produzisse uma resposta de ativação cortical do eletrodo cortical já implantado nas coordenadas do córtex auditivo primário e concomitantemente registrado. Feito isso, o eletrodo de estimulação elétrica do NBM foi implantado. Os elétrodos foram conectados aos pinos de um soquete macho da Omnetics. Foram implantados 4 parafusos de aço inoxidável (3,6mm de altura e 1,4mm de diâmetro) para fixação do implante ao crânio, finalizado com adesivo de cianoacrilato de alta densidade.

Registro

O eletrocardiograma foi monitorado por meio de elétrodos de prata (Neurovirtual) de contatos de aproximadamente 35 mm de diâmetro que foram colocados externamente na região da caixa torácica tricotomizada do animal e aderidos com o auxílio da pasta condutora. Esses eletrodos eram presos a uma cinta de velcro envolvendo o tórax do rato. O sinal analógico dos eletroencefalograma e o eletrocardiograma foram adquiridos pelo aparelho Nihon Kohden, Neurofax 4414-K de 14 canais e digitalizados por meio da placa digitalizadora Lynxtec, AC1160 com frequência de amostragem de 500Hz. O eletroencefalograma dos animais foi monitorado durante todas as sessões de treinamento e teste. Nos cuidados pré e pós-cirúrgicos, realizou-se a higienização da pele lateral ao implante com povidine e pomada de sulfato de neomicina e recobriu-se os olhos do animal com lubrificante à base de água para se evitar o ressecamento durante a cirurgia. Na analgesia pós-cirúrgica, administrou-se paracetamol (4,2mg/kg) via oral dois dias após a cirurgia.

Figura 2: Esquema da montagem do protocolo de condicionamento clássico da aprendizagem comportamental auditiva. O rato foi colocado na caixa de comportamento localizada no interior de uma guaiola de Faraday com sistema de iluminação por leds de alto brilho, câmera infra-vermelha, caixa de som no teto e isolamento acústico. Essa guaiola ainda tinha conexão com os aparelhos de monitoração das atividades do animal (vídeo para observação do comportamento animal, sistema de EEG analógico, uma placa digitalizadora do sinal analógico que era registrado e armazenado pelo programa AQDADOS) e entradas dos estímulos de um aparelho estimulador elétrico (estímulo tétrico 100Hz e duração de um estímulo 200ms) e sonoros (1-15kHz). O aparelho de EEG amplificava o sinal elétrico do cérebro do rato que na ordem 100.000 vezes a seu valor real na sua saída.

Protocolo de condicionamento ao som de 6 kHz

O treinamento comportamental foi iniciado após a recuperação cirúrgica do rato que era no mínimo de uma semana. A cada dia de treino, o animal foi anestesiado com halotano (5%) para a conexão do cabo de transmissão do sinal dos eletrodos cerebrais e intercostais. O animal despertava dentro da caixa de comportamento ($40 \times 40 \times 50\text{cm}^3$), com grade no fundo à 6 cm de altura contendo alimento e água ad-libitum e essa era inserida dentro de uma câmara de isolamento acústico ($89,5 \times 79 \times 54\text{cm}^3$). A câmara de isolamento acústico também era uma gaiola de Faraday e continha um sistema de câmera para visualizar o comportamento do animal, leds brancos de 2200 candelas para iluminação ambiente e uma caixa de som no seu teto interior.

Após 10 minutos de habituação inicial na caixa de comportamento, os animais foram expostos ao **teste 0**: um teste com liberação de 15 sessões de um conjunto de sons puros (1, 2, 3, 6, 10, 12 e 15 kHz) aleatorizados tanto no aparecimento e quanto no período entre os sons de 30 – 45 s. No dia seguinte, os animais foram submetidos a 200 sessões de treino diário de aproximadamente 3 horas, por 15 dias consecutivos, nas quais os ratos foram classificados em dois grupos: **pareado** (n=4) e **não-pareado** (n = 5). No grupo pareado as sessões consistiam no aparecimento do som puro de 6 kHz à 70 dB por 2000ms e 1800ms após o seu início, ocorria a estimulação elétrica do NBM do animal em pulsos bipolares com duração de 400us cada, à 90uA em média, frequência de 100 Hz e duração total de 200 ms. A corrente foi calculada para cada animal após o experimento finalizado por meio do cálculo da impedância do eletrodo de estimulação do NBM in vivo (**ver Anexo 1**).

Por sua vez o grupo não-pareado recebeu o mesmo número de estímulos auditivos e estímulos elétricos no NBM nas mesmas intensidades que o grupo pareado, porém com ordem de apresentação de ambos os estímulos programada de forma aleatória e nunca pareada sendo cada sessão sempre iniciada pelo estímulo elétrico no NBM seguido do auditivo de 6 kHz 8 segundos depois. Um intervalo de 30-58s no grupo pareado e de 30-50s foi aleatorizado entre as apresentações de estímulos.

No 16º dia após o início do condicionamento clássico, realizou-se o **teste 1**: teste idêntico ao teste0 e igual para ambos os grupos. Os animais foram testados na mesma câmara em que foi feito o treinamento. O EEG e o ECG foram gravados. Após 10 minutos de habituação, os sujeitos receberão 105 sessões-testes que consistiram de 105 repetições da mesma seqüência aleatória de 7 tons (15, 1, 12, 2, 10, 3, 6 kHz) cada um com duração de 2 s apresentados à 70-100 dB aleatorizados tanto no aparecimento e quanto no período entre os sons de 30 - 45s.

Registros eletrofisiológicos

Os registros eletroencefalográficos e eletrocardiográficos foram armazenados por meio do programa AQDADOS de apresentação e arquivamento dos sinais eletrofisiológicos juntamente com os sinais de disparo dos sons puros e do estímulo elétrico adquiridos como ondas quadradas ou sinais de trigger. Esses eram enviados pelo próprio aparelho de estimulação elétrica e sonora quando eliciados no protocolo coportamental. As análises correlativas dos sinais foram realizadas por rotinas desenvolvidas no programa Matlab (vide o item Análise) em que se determinou as funções de **coerência ordinária** para se estudar a conectividade funcional das estruturas neurais monitoradas e padrão complexidade. Além dessas análises, calculou-se também a **freqüência cardíaca**.

A análise da freqüência cardíaca foi normalizada para cada um dos sujeitos transformando-se o sinal de eletrocardiograma, em freqüência cardíaca instantânea por meio do programa Matlab. Para cada animal as freqüências cardíacas de cada trecho foram detectadas por meio de um programa especialmente desenvolvido para calcular a freqüência cardíaca instantânea e também para subtrair automaticamente a presença dos ruídos do sinal original de EKG digitalizado. A acurácia da detecção das batidas cardíacas e da rejeição automática foi verificada manualmente sendo que as correções necessárias para os sinais de EEG e EKG foram realizadas manualmente.

As freqüências cardíacas dos animais foram analisadas quanto as suas médias nos trechos de 2 segundos na ordem dos intervalos: pré-estímulo (4 s), som (2 s das seguintes freqüências: 15, 1, 12, 2, 10, 3 e 6 kHz) e pós-estímulos (4 s),

Figura 3: Esquema do treinamento e do teste do condicionamento clássico ao som de 6kHz.

Todos os animais eram testados para os diferentes sons (1, 2, 3, 6, 10, 12, 15 kHz) apresentados em sequência e intervalo de tempo entre sons aleatórios) no teste 0. Os ratos do grupo pareado começavam um trial recebendo um estímulo de 6kHz, à 70 dB, de 2s de duração e ao seu final, um estímulo elétrico no NBM em média de 90 uA, à 100Hz por 200 ms. Já os ratos do grupo não-pareado receberam inicialmente o estímulo elétrico no NBM e após oito segundos o estímulo de 6kHz sendo os estímulos nas mesmas condições que o grupo pareado, diferindo apenas temporalmente em suas apresentações. Os dois grupos foram treinados durante 15 dias com 200 trials diários e seus EEG e ECG adquiridos na situação de testes. Após os 15 dias de treino com os estímulos elétrico e sonoro, o teste 1 foi adquirido. O teste 1 foi idêntico ao teste 0 e igual para ambos os grupos.

obs: Um sinal de trigger marcou o aparecimento dos sinais do estímulo elétrico e dos sonoros no arquivo de EEG e ECG.

totalizando 10 s por trial. Foram analisadas até 15 séries de cada som. Para cada série foram coletados 5000 pontos à frequência de 500 Hz.

Assepsia e cuidado com os animais

Nos cuidados pré e pós-cirúrgicos, realizou-se a higienização da pele lateral ao implante com povidine e pomada de sulfato de neomicina e recobriu-se os olhos com lubrificante à base de água para se evitar o ressecamento durante a cirurgia. Na analgesia pós-cirúrgica, administrou-se paracetamol (4,2 mg/kg) via oral dois por dias no período pós-cirúrgico.

Caso os tímpanos não estivessem saudáveis, o protocolo de teste ou treinamento não era iniciado. Semanalmente o tímpano de cada animal foi verificado com o auxílio de um otoscópio pediátrico, os animais eram pesados e seus implantes eram limpos para impedir possíveis infecções.

Histologia

A verificação da localização dos elétrodos subcorticais foi realizada ao final dos experimentos por meio de lesão eletrolítica contínua de 100 μ A por 5 s sob anestesia intraperitoneal de cloridrato de cetamina (150 mg/kg) ou thiopental (25mg/kg). Depois, os ratos foram sacrificados com uma dose letal de anestésico de cloridrato de cetamina (450 mg/kg) ou tiopental (75 mg/kg) intraperitoneal e perfundidos com paraformaldeído a 4%. Os elétrodos implantados foram cuidadosamente retirados após a perfusão dos cérebros. Os cérebros foram crioprottegidos em solução de glicose 20% cortados envoltos por gelo seco em fatias de 40 μ m de espessura em plano coronal com micrótomo (Leica, SM 2000R). Os cortes foram armazenados em solução de azida (antifúngico) e coloridos com tiamina, coloração de Nissl para corpos celulares, para verificação da posição dos elétrodos subcorticais e analisados em microscópio óptico (Zeiss, Axioskop 40).

Para dois ratos, foi realizada a imuno-histoquímica para o anticorpo primário da enzima ChAT para confirmação da presença de neurônios colinérgicos do grupamento Ch4 na região do eletrodo de estimulação NBM implantado. Os cortes foram guardados em solução anticongelante a 4°C. Eles foram incubados primeiramente, o anticorpo policlonal de cabra para ChAT (diluição 1:1000,

Chemicon) diluído em tampão fosfato de potássio contendo 0,4% de Triton X-100 e 10% de soro de burro (Jackson) por 48 h a 4°C. Depois os cortes foram tratados com anticorpo biotinilado anticabra feito em burro (diluição 1:1000, Chemicon) diluído em tampão fosfato de potássio contendo 0,3% Triton e 1% de soro de burro por 2 h à temperatura ambiente. Então, os cortes reagiram com a avidina Texas Red por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, fez-se a reação de revelação com a DAB (Diaminobenzidina, Sigma) e depois a intensificação da coloração em 0,05% solução de tetróxido de ósmio.

Os cortes então foram colocados na lâmina de microscopia e fotografados por meio de microscópio óptico (Zeiss, Axioskop 40) com câmera fotográfica digital acoplada (Canon Power Shot- A620, 5 megapixels).

Histologia

O posicionamento dos eletrodos foi verificado em cortes histológicos tratados com ChAT de dois ratos: do grupo pareado e outro do grupo não-pareado. A linha tracejada indica a posição do eletrodo em todas as figuras, mas na figura “c” e “d” indicam o rastro deixado pelo eletrodo mas apenas a ponta é apresentada no corte devido a diferenças nos ângulos de corte na microtomia entre o eletrodo a posição de corte do encéfalo.

Figura 4. a) Rastro de eletrodo de rato do grupo pareado e b, c, d) rastro de eletrodo de rato de grupo não-pareado. Os eletrodos de registro e o de estimulação estavam no hemisfério esquerdo do animal e

os asteriscos indicam localização da ponta do eletrodo. As células marcadas em marrom são ChAT-positivas da região de Ch4 (globo pálido interno, substância inominada).

Figura 4.e: Posicionamento dos eletrodos de estimulação do NBM determinada pela histologia. O erro no eixo antero-posterior foi de $\pm 2,3$ mm em média. No caso mais anterior o eletrodo acertou o globus pallidus interno anterior em -2,04 mm após o bregma e no caso mais posterior, em -2,7 mm após o bregma, também na região do globus pallidus interno. Os círculos azuis são os ratos do grupo não-pareado e os vermelhos do grupo pareado. Em verde está indicada a direção de inserção do eletrodo de estimulação, posicionado no hemisfério direito, contralateral ao lado da estimulação. A figura (nº. 52) foi retirada e modificada do atlas de Paxinos e Watson, 5ª edição.

Tabela 1. Lista de ratos experimentais

RESULTADO DE HISTOLOGIA					
Pareados (n=4)	A1	M1	NBM (estímulo)	NBM (registro)	hipocampo
CIRO *	✓	✓	✓	✓	✓
DALTON	✓	✓	Próximo ao globo pálido interno, reticular do tálamo	Próximo ao globo pálido interno, reticular do tálamo	✓
DITO	✓	✓	✓	✓	✓
EULER	✓	✓	Próximo ao globo pálido interno, em reticular do tálamo	Próximo ao globo pálido interno, em reticular do tálamo	✓
Não-pareados (n=5)	A1	M1	NBM (estímulo)	NBM (registro)	hipocampo
CAIO **	✓	✓	✓	✓	✓
CESAR	✓	✓	✓	Próximo à cápsula externa, no reticular do tálamo	✓
DAVI	✓	✓	✓	✓	✓
DANY	✓	✓	✓	Próximo ao globo pálido interno, na cápsula interna	✓
ENIO	✓	✓	✓	✓	Cápsula interna, 0,2mm rostral ao globo pálido interno

Nota: Apesar de o posicionamento do eletrodo de registro do NBM estar correto, o sinal de EEG adquirido de qualidade ruim, ou seja, com infiltrações de ruído de 60 Hz maiores que o sinal de LFP, (**) para o rato CAIO e o (*) de M1 de qualidade ruim para o rato CIRO. O eletrodo do hipocampal auxiliou separar os diferentes estágios de vigília atenta ou vigília relaxada e sono, se houvesse.

Análise de Sinais

Procedimentos para cálculo de frequência cardíaca instantânea

Inicialmente fez-se o reconhecimento do intervalo RR do sinal obtido pelo eletrocardiograma em duas etapas. Primeiramente fez-se reconhecimento automatizado utilizando uma rotina computacional. A rotina funcionava da seguinte forma:

1. O segmento de um sinal de ECG é normalizado para que os sinais tivessem a mesma escala de amplitude para todos os segmentos.
2. Seis níveis de limiares para a amplitude foram estabelecidos para detectar a porção S do ciclo de batimento cardíaco. O instante de cruzamento do sinal com um dado limiar era considerado como indicativo da curva S do ciclo de batimento cardíaco.
3. O limiar que apresentasse o padrão de batimento cardíaco mais plausível era considerado o de escolha. A plausibilidade era dada pelos valores da média e variabilidade (variância) de batimentos cardíacos no intervalo.
4. O intervalo SS assim obtido foi utilizado como estimativa do intervalo RR.

No procedimento acima, a frequência de batimento cardíaco obtida por um determinado limiar era considerada plausível se a frequência estimada estivesse no intervalo de 250 a 550 bpm (batimentos por minuto) e se a variabilidade fosse a menor dentre as três possibilidades. Caso os seis limiares não resultassem em frequências cardíacas plausíveis, o segmento do sinal em questão era descartado.

Cálculo do ECG evocado

O cálculo do ECG evocado foi realizado obtendo-se inicialmente a frequência instantânea a partir dos intervalos RR estimados e em seguida calculando a média de acordo com os agrupamentos considerados.

Cálculos do ECG médio por período

Cada tentativa foi dividida em intervalos com relação ao estímulo:

- a) período anterior - 4 s antes do som;

- b) período de estimulação - 2 s de duração do som;
- c) período posterior - 4 s após a apresentação do som.

A frequência cardíaca média então foi calculada.

Modelo auto-regressivo multivariado

Neste trabalho o modelo auto-regressivo multivariado foi utilizado para se estimar a densidade espectral de potência e a coerência. O modelo auto-regressivo pode ser entendido como um modelo de regressão linear múltipla em que a variável independente é o passado da variável dependente, o que explica a origem da denominação.

Podemos expressar matematicamente os sinais da seguinte forma:

$$X_i(t) = \sum_{j=1}^K \sum_{m=1}^p a_{ij}(m) X_j(t-m) + U_i(t),$$

$$i = 1, \dots, K \quad t = m, m+1 \dots$$

onde $\{X_i(t): i=1, \dots, K\}$ são os i -ésimos sinais no instante t , correspondentes à cada área cerebral e $\{a_{ij}: i, j=1, \dots, K\}$ são os coeficientes do modelo auto-regressivo relacionando o passado do j -ésimo sinal ao futuro do i -ésimo sinal. A inovação U_i é um ruído branco cuja covariância $\text{cov}(U_i, U_j)$ será denotada por Σ_{ij} e a matriz associada por Σ .

Para facilitar a discussão que se segue definiremos as seguintes quantidades

$$A_{ij}(\lambda) = \delta_{ij} - \sum_{m=1}^p a_{ij}(m) \exp(-i2\pi m\lambda).$$

Essa última quantidade é conhecida na engenharia como função de transferência associada ao modelo auto-regressivo.

A matriz cujos elementos são os $\{A_{ij}(\lambda), i, j = 1, \dots, K\}$ é representado por $A(\lambda)$ e sua inversa por $H(\lambda)$.

Densidade espectral de potência

É clássica a descrição de sinais elétricos utilizando a densidade espectral de potência em praticamente todas as áreas em que a caracterização do sinal é importante. Ele mede, intuitivamente, a proporção do sinal que oscila numa determinada frequência.

Dito de outra maneira, suponha que seja possível decompor o sinal elétrico em uma soma de funções senos e cossenos com frequências e amplitudes distintas. A densidade espectral de potência mede a proporção da amplitude total do sinal que é devido à amplitude do seno e do cosseno numa determinada frequência.

Podemos pensar no seguinte modelo. Seja x_t o seu sinal no instante t . Suponha que o sinal possa ser escrito como $x_t = a \cdot \cos(0,25\pi t) + b \cdot \sin(0,37\pi t)$. A amplitude total do seu sinal é dada pela expressão $a^2 + b^2$ e a amplitude devido ao componente de 0,25 rad/s (50 Hz se o sinal foi amostrado em 200 Hz) é a^2 . Assim, a proporção da amplitude total devido ao componente de 0,25 rad/s é igual a $a^2 / (a^2 + b^2)$.

Em eletrofisiologia, essa quantidade torna-se interessante uma vez que muitos estados comportamentais podem ser identificados pela descrição da densidade espectral de potência. Os exemplos clássicos são os estágios do sono e das epilepsias.

Para esse trabalho procurou-se caracterizar a banda de frequência gama que corresponde à faixa entre 30 a 90 Hz. Recentemente tem se investigado a sua correlação com diferentes fenômenos como alerta, atenção e integração de informação. Acredita-se que a sua presença indique uma sincronização local dos neurônios da área de registro.

A densidade espectral de potência é calculada pela seguinte fórmula:

$$S_{ij}(f) = H_i(f) \Sigma H_j^*(f),$$

em que H_i é a i -ésima linha da matriz H e o asterisco indica o conjugado transposto.

Conectividade funcional

Um grande número de evidências tem mostrado que o sistema nervoso é constituído por áreas que se diferenciam em tipos celulares, densidade celular e projeções neuronais. Baseando-se em estudos de lesões de áreas específicas e mais

recentemente de ressonância magnética funcional têm se mostrado que as áreas cerebrais são altamente correlacionadas com determinados comportamentos animais. Assim, uma tendência da neurociência sistêmica atual tem sido o estudo sistemático do papel das áreas cerebrais na realização de determinadas tarefas, atribuindo-se funções às diferentes áreas.

Embora muitos avanços tenham sido obtidos, o paradigma de localização funcional não parece ser suficiente para explicar importantes aspectos do funcionamento cerebral. Talvez o principal limitante do paradigma seja a ausência do conceito de dinâmica, ou seja, o tempo não é incluído como parâmetro na maioria dos estudos realizados para identificação de áreas cerebrais.

Nesse contexto, o conceito de conectividade funcional entre áreas cerebrais se tornou uma ferramenta importante para o estudo da dinâmica do sistema nervoso. Esse conceito refere-se ao estudo de como as diferentes áreas cerebrais se interagem no tempo e espaço.

Diferentes métodos para a inferência da conectividade funcional têm sido propostos: correlação, correlação parcial, coerência, coerência parcial direcionada, informação mútua, entre outros. Em eletrofisiologia, uma medida bastante difundida é a coerência espectral e será o método de escolha para a análise de conectividade funcional nesse trabalho.

Coerência espectral

A coerência espectral ou simplesmente coerência é uma medida de dependência linear no domínio da frequência bastante difundida em eletrofisiologia. Intuitivamente podemos entender essa medida como sendo a correlação linear entre as amplitudes dos componentes na mesma frequência de dois sinais distintos. Em eletrofisiologia, a coerência é o método que permite medir a quantidade de “interação” de duas áreas numa determinada frequência durante um período específico. Na literatura de neurofisiologia é comum associar à essa medida a idéia de sincronia entre áreas cerebrais.

Na prática o cálculo da coerência (quadrática) é realizada utilizando-se a seguinte expressão:

$$Coh_{ij}^2(f) = \frac{|S_{ij}(f)|^2}{S_i(f)S_j(f)}$$

Todas as rotinas de análise espectral estão implementadas em MATLAB que foram especificamente modificadas para lidar com protocolos experimentais relacionados a evento.

Análise estatística

Para comparação de estimativas de espectro de potência entre duas condições experimentais, utilizou-se o teste *t* não-pareado simples. Adotou-se o procedimento padrão de análise de regressão linear com cálculo de coeficiente de correlação *r* de Pearson e o uso de estatística *t* para se rejeitar a hipótese nula de nulidade de *r*.

Resultados

Registros de ratos dos grupos pareado e não-pareado em treinamento

Apresentamos a seguir, exemplos de trechos de registros de potenciais de campo das áreas primárias auditiva (A1) e motora (M1), núcleo basalis magnocelularis (NBM), traçados de eletrocardiograma (ECG) e marcadores temporais dos estímulos auditivo e elétrico. Selecionaram-se traçados de dois ratos do grupo pareado (CIRO e DITO) e quatro ratos do protocolo não-pareado (CAIO, CÉSAR, DANY E DAVI).

Exemplo 1: Rato não-pareado CAIO

Figura 5- Traçado do rato não-pareado (CAIO) com os registros do potencial de campo local das áreas cerebrais A1, M1 e NBM nas primeiras três linhas e a frequência cardíaca na 4ª linha. Na 5ª linha, ocorre o sinal da estimulação elétrica no NBM com 0,2 s de duração e na última linha, a espícula indica o início da estimulação sonora de 6 kHz de 2 s de duração. Os dois estímulos o elétrico e o sonoro eram separados por 8 s de intervalo. Tempo do traçado em segundos. Note que a estimulação elétrica do NBM (5ª linha) provocou diminuição da amplitude da voltagem em A1 (1ª linha), mas não em M1 (2ª linha) nem em NBM (3ª linha). A dessincronização por estimulação do NBM fica mais evidente quando o rato está no estado de vigília relaxada ou sono de ondas lentas e a estimulação dessincroniza o EEG cortical.

Exemplo 2: Rato pareado CIRO

Figura 6- Traçado do rato pareado (CIRO) com os registros do potencial de campo local das áreas cerebrais A1, M1 e NBM, frequência cardíaca e estimulação elétrica no NBM como descrito na Figura 5. Tempo do traçado em segundos. Na 5ª linha, ocorre o sinal da estimulação elétrica no NBM com 0,2 s (traço largo em preto) de duração e na 6ª linha, o pulso estreito que indica o início do estímulo sonoro de 6 kHz de 2 s de duração. Note que a estimulação elétrica do NBM (5ª linha) provocou diminuição da amplitude da voltagem do A1 (1ª linha) e em NBM (3ª linha) mas não evidente em M1 (2ª linha).

Exemplo 3: Rato pareado CÉSAR

Figura 7. Traçado do rato não-pareado (CÉSAR) com registros do potencial de campo local das áreas cerebrais A1, M1 e NBM, frequência cardíaca e estimulação elétrica no NBM como descrito na Figura 5 e o tempo do traçado está em segundos. O animal está inicialmente em vigília relaxada e com ondas lentas antes do estímulo. Note que a estimulação elétrica do NBM (5ª linha) provocou uma leve diminuição da amplitude da voltagem do A1 (1ª linha), mas este efeito não é muito evidente em M1 (2ª linha) e em NBM (3ª linha).

Exemplo 4: Rato pareado DANY

Figura 8. Registros do rato não-pareado (DANY) com potencial de campo local das áreas cerebrais A1, M1 e NBM, frequência cardíaca e estimulação elétrica no NBM, como descrito na Figura 5 A. O tempo do traçado está em segundos. O animal está inicialmente em vigília relaxada e com poucas ondas lentas antes do estímulo. Note que a estimulação elétrica do NBM (5ª linha) provocou uma leve diminuição da amplitude da voltagem do A1 (1ª linha) e também em M1 (2ª linha), mas não em NBM (3ª linha).

Exemplo 5: Rato não-pareado DAVI

Figura 9. Trecho do rato não-pareado (DAVI) com registros do potencial de campo local das áreas cerebrais A1, M1 e NBM, frequência cardíaca e estimulação elétrica no NBM, como descrito na Figura 5. O tempo do traçado está em segundos. O animal está em vigília relaxada e com poucas ondas lentas antes do estímulo elétrico. Neste trecho em particular, não se observa dessincronização evidente em A1 (1ª linha) à estimulação elétrica do NBM (5ª linha), mas mais evidente em NBM (3ª linha) e em M1.

No exemplo da Figura 9, rato DAVI, a dessincronização induzida pelo estímulo elétrico do NBM não é facilmente identificável pela inspeção visual dos traçados. A dúvida pode ser sanada determinando-se a densidade espectral de potência, em que se deve constatar diminuição do espectro nas baixas frequências, ao

mesmo tempo em que há aumento nas altas frequências. Vide exemplo deste tipo na Figura 17, adiante.

Exemplo 6: Rato pareado DITO

Figura 10. Traçado do rato pareado (DITO) com os registros do potencial de campo local das áreas cerebrais A1, M1 e NBM, frequência cardíaca e estimulação elétrica no NBM como descrito na Figura 6. Tempo do traçado em segundos. Na 5ª linha, ocorre o sinal da estimulação elétrica no NBM com 0,2 s de duração e na 6ª linha, o sinal que indica o início do estímulo sonoro de 6 kHz de 2 s de duração. Os dois estímulos elétrico e o sonoro eram separados por 8 s de intervalo. Note que a estimulação elétrica do NBM (5ª linha) provocou um evidente efeito na diminuição da amplitude da voltagem do A1 (1ª linha) e em NBM (3ª linha) apesar da oscilação da linha de base, ocorre dessincronização pois há uma regularidade do sinal teta de vigília que não ocorre em M1 (2ª linha).

Efetividade do estímulo sonoro

Para a correta interpretação dos resultados é importante garantir a integridade dos sistemas estudados (no caso, o sistema auditivo).

Pelo fato de se realizar cirurgia com fixação do rato no estereotáxico, tomou-se o cuidado de utilizar barras auriculares com pontas rombas para evitar lesões nos ouvidos médio e interno do rato. Mas para garantir a integridade do ouvido, após a cirurgia e antes do início do protocolo experimental de manipulação, treinamento e registro, examinou-se os ouvidos com uso de otoscópio pediátrico para comprovar ausência de lesões da membranas timpânicas nos ratos utilizados.

Descreve-se a seguir, verificações adicionais tomadas após os experimentos para garantir que os estímulos sonoros e elétricos foram efetivos para evocar as respostas neuronais normais. Além da verificação da efetividade através das análises

do traçado, foram utilizadas análises matemáticas dos potenciais de campo local e de batimento cardíaco.

Potenciais evocados no córtex auditivo primário (A1) ao estímulo sonoro no período pré-treinamento

Uma vez que o desenho do protocolo experimental não requer que ratos exibam qualquer comportamento específico frente aos estímulos sonoro ou elétrico do NBM, foi necessário garantir que os estímulos fossem adequados para evocar respostas eletrofisiológicas no córtex auditivo primário. Para comprovar a efetividade do estímulo sonoro, promediou-se o potencial de campo local do córtex auditivo aos tons para se obter o potencial evocado. Estimou-se também a densidade espectral de potência média nos períodos pré, durante e pós-apresentação do estímulo sonoro.

Apresentamos a seguir respostas evocadas em dois ratos, Figuras 11 e 12, para ilustrar os padrões de respostas de potenciais evocados auditivos típicos, que indicam integridade da resposta cortical. Estes registros foram obtidos antes do início dos treinamentos.

Potencial evocado auditivo: Rato não-pareado CAIO

Na Figura 11 tem-se um exemplo em que os potenciais evocados estão claramente presentes em todas as frequências de tons utilizados (1, 2, 3, 6, 10, 12 e 15 kHz). Nesta janela de 10 s de promediação, o estímulo sonoro aparece no intervalo de 4 a 6 s. Em uma dada sessão de testagem ou de treinamento, cada tom foi apresentado 15 vezes em sequência aleatória. Para cálculo do potencial evocado, no entanto, descartou-se aquelas tentativas com artefatos ou ruídos no sinal, bem como naqueles trechos em que o rato não apresentava claro estado de vigília. Assim, os números entre parênteses junto aos valores de frequência do tom de estimulação na ordenada indicam as tentativas que foram efetivamente consideradas para o cálculo dos potenciais evocados. Por exemplo, na frequência de 6 kHz foram consideradas 13 tentativas, enquanto somente quatro e cinco tentativas nas frequências de 10 e 12 kHz. Note que por isso estes traçados parecem mais ruidosos. Por outro lado, a promediação usando todas as 68 tentativas mostra um traçado praticamente liso, evidenciando muito bem a resposta característica ao estímulo sonoro, evidência da integridade das vias auditivas até o nível cortical.

Figura 11. Potenciais evocados auditivos do rato “CAIO” obtidos antes do início do treinamento. O estímulo sonoro foi apresentado no intervalo 4 a 6 s. Portanto, a janela de tempo de promediação inclui 4 s que precedem o estímulo e 4 s pós-estímulo sonoro. Os diferentes traçados correspondem aos potenciais evocados para diferentes frequências de tons (1, 2, 3, 6, 10, 12 e 15 kHz), identificados na abscissa, e o último traçado corresponde à média de todas as tentativas. Os números entre parênteses são as quantidades de tentativas consideradas na promediação, após descarte daquelas tentativas com artefatos, ruídos ou em que fase de sono. Observe que o potencial evocado considerando todas as frequências, perfazendo 68 tentativas, tem um nível de ruído menor na linha de base; neste caso, observa-se claramente os potenciais de ativação no início e na cessação do estímulo sonoro. A latência do primeiro vale em relação ao início do estímulo sonoro é de aproximadamente 40 ms. A amplitude da resposta na “cessação” do tom é menor (aproximadamente 50%) do que a observada no início do estímulo.

Observa-se resposta ao tom evidente e com formato característico no início e na cessação do estímulo, mas aparentemente nenhuma alteração durante a manutenção do tom, entre 4 e 6 segundos. Há uma latência de aproximadamente 40 ms entre o início do estímulo sonoro e deflexão máxima da resposta neural.

Potencial evocado auditivo: Rato pareado CIRO

A Figura 12 mostra o potencial evocado auditivo de outro rato, com um padrão de resposta bastante similar ao da Figura 11. A polaridade da respostas no início e na cessação do estímulo sonoro está invertida em relação aos traçados da Figura 11, o que é considerado normal tendo em vista que os potenciais locais foram

obtidos com eletrodos bipolares. A latência do primeiro pico é de aproximadamente 50 ms.

Figura 12. Potenciais auditivos evocados no animal “CIRO” (para outros detalhes vide legenda da Figura 11). Neste rato a deflexão das resposta está invertida em relação ao rato “CAIO” e a latência do primeiro pico da resposta foi 53 ms com relação ao início do estímulo sonoro. Esta resposta inicial foi bastante consistente, mas a amplitude para a cessação do estímulo foi baixa e frusta, nem sempre evidente para todas as frequências de tons testados, o que pode ser melhor apreciado no traçados promediado usando todas as 50 tentativas válidas.

As ondas de resposta à cessação do som estão presentes, mas são menos evidentes que no primeiro exemplo.

Análise espectral: Efeito do estímulo sonoro

A visualização dos traçados e a determinação de potenciais evocados auditivos, bem como cálculo de entropia amostral, que utilizaremos mais adiante, são procedimentos e medidas no domínio do tempo. Para caracterização dos aspectos dinâmicos é interessante observarmos os mesmos trechos de registros biológicos por meio de instrumentos matemáticos no domínio da frequência. Aqui utilizaremos a densidade espectral de potência e a coerência espectral quadrática como medidas no domínio da frequência.

As análises em ambos os domínios, do tempo e frequência, são complementares, pois cada qual permite caracterizar aspectos distintos e similares da dinâmica de um sinal biológico.

Análise espectral correspondente aos registros do Exemplo 1

Figura 13 mostra os resultados da análise espectral bivariada dos mesmos registros considerados na Figura 11, ou seja, do rato CAIO antes do início do treinamento.

Figura 13. Análise espectral promediada de um rato (CAIO) das áreas motora primária (M1e) e auditiva primária (A1e) do hemisfério esquerdo, correspondente aos registros da Figura 11, sincronizada com estímulo sonoro apresentado no intervalo de 4 a 6 s. A banda vertical corresponde a um intervalo 500 ms (250 pontos amostrados a 500 Hz) sobre o qual se estimou o modelo auto-regressivo e calculou-se as densidades espectrais de potência e a coerência. Durante o estímulo, observou-se em A1e aumento do componente espectral gama (40 Hz) e uma redução da densidade espectral em frequências mais baixas. Este efeito encontra-se ainda mais exacerbado no período pós-estímulo (setas azul). No período correspondente ao início e final dos estímulos, observa-se diminuição transitória de componentes espectrais de alta frequência com aumento de baixa frequência (indicadas com setas vermelhas). Na área motora também se observa mudanças nos padrões espectrais principalmente no período pós-estímulo. Não se observou, nas medidas promediadas, flutuações significativas da coerência.

Na Figura 13, a abscissa delimita 10 s correspondente ao mesmo intervalo utilizado na Figura 11; a ordenada representa a frequência de 0 a 50 Hz; nos dois gráficos superiores, a escala de cor representa a densidade espectral de potência em dB e a escala de coerência quadrática vai de 0 a 1. A análise foi realizada tomando-se trechos de 0,5 s, sem sobreposição entre segmentos adjacentes, assim a localização da banda vertical corresponde ao trecho de análise.

Nesta janela de 10 s, o estímulo sonoro foi apresentado no trecho de 4 a 6 s. Uma análise visual do espectro do córtex auditivo, A1e, evidencia uma mudança brusca do padrão do espectro, o que reflete a desestabilização do córtex auditivo pela apresentação do som. Em seguida, há um aumento da potência na banda gama e uma redução das baixas frequências, um claro correlato de ativamento cortical, corroborando as outras análises que apontavam para a integridade do processamento auditivo neste indivíduo.

Figura 14. Médias de densidades espectrais de potência e coerência clássica nos períodos pré, durante e pós-estímulo do rato CAIO antes do início dos treinamentos. Observe no gráfico do espectro de potência de A1e que há nítido aumento do pico do espectro em 40 Hz para o registro obtido no período após o estímulo sonoro, o que corrobora o padrão espectral em escala de cores observado na Figura 13. Adicionalmente há diminuição dos componentes espectrais nas baixas frequências, que representa um quadro característico de dessincronização da atividade cerebral. Não se observou alteração significativa da coerência entre M1e e A1e.

Análise espectral correspondente aos registos do Exemplo 2

Figure 14. Exemplo de análise similar ao da Figura 13 (rato CIRO). Observa-se novamente os mesmos padrões, isto é, aumento do componente gama e redução nas frequências baixas durante e no período pós-estímulo.

Figura 14. Análises de densidade espectral de potência e coerência espectral dos períodos pré, durante e pós-estímulo no rato CIRO. Observa-se novamente na densidade espectral de potência aumento do componente gama durante e no período pós-estímulo sonoro (seta) e diminuição dos componentes de baixa frequência que caracteriza o estado de dessincronização. Note-se que não há alteração significativa do coerência quadrática.

Mesmo com a promediação de um pequeno número de tentativas (no máximo 15 por frequência e 105 no total) foi possível evidenciar respostas no córtex auditivo mostrando que o fenômeno é robusto. Evidentemente quanto maior o número de tentativas consideradas mais “limpas” são as respostas observadas. Neste sentido, o componente da banda gama do espectro foi observado sistematicamente nas médias da densidade do espectro de potência do córtex auditivo, em todas as frequências de estimulação testadas.

Monitoração longitudinal da efetividade do estímulo sonoro pela checagem do ERP ao longo do treinamento e estimulação

Para garantir-se que os estímulos sonoros foram efetivos, bem como integridade dos eletrodos de registros de potenciais de campo durante todo o experimento, os potenciais evocados sonoros do córtex auditivo primário foram monitorados ao longo de todo o experimento. Obteve-se, para todos os ratos considerados, em todas estas ocasiões, respostas evocadas similares às apresentadas nas Figuras 11 e 13.

Efetividade do estímulo elétrico do NBM

É importante verificar, além da integridade das respostas auditivas, a efetividade da estimulação elétrica do núcleo basalis. Estes resultados, interpretados à luz da histologia, aumentam a confiabilidade dos resultados.

A verificação do traçado, conforme as figuras 5 a 10, é um forte indicador da efetividade da estimulação do núcleo basalis sobre o córtex. Caracterizações adicionais revelam importantes aspectos destas respostas.

Dessincronização

Pode-se constatar dessincronização do potencial de campo cortical por meio de análise espectral, em que se constata significativa diminuição do espectro em baixas frequências e um aumento nas altas frequências. Determinou-se a densidade espectral para os períodos pré e pós-estímulo elétrico para se quantificar a dessincronização. Este exemplo corresponde ao traçado observado na Figura 5. Para o cálculo utilizou-se segmentos com três segundos de duração, em que o período pré-estímulo correspondeu ao período entre sete e três segundos precedendo a estimulação e o período pós-estímulo ao segmento entre dois a cinco segundos após a estimulação. Observa-se uma queda no valor da densidade espectral após a estimulação elétrica comprovando a dessincronização.

Figura 17. Estimativas de densidades espectrais de potência dos períodos antes (linha contínua) e depois (linha pontilhada) de um estímulo elétrico do rato CAIO (trecho correspondente à figura 5). Observa-se uma queda da densidade espectral nas baixas frequências (< 5Hz) após o estímulo elétrico, caracterizando a dessincronização do córtex auditivo pós-estímulo do NBM.

Efeito da estimulação pareada do NBM e sonoro específico para a frequência de 6 kHz

Densidade espectral de potência de grupos pareados e não-pareados

Para verificar-se a efetividade do pareamento na indução de plasticidade específica para o som treinado, foram realizadas análises comparativas entre os ratos do grupo pareado e os do grupo que recebeu o treinamento não-pareado.

Em particular, buscou-se diferenças significativas relacionadas ao tom apresentado durante o treino.

Verificaremos inicialmente o padrão de densidade espectral e coerência de dos trechos anteriores, concomitantes e posteriores aos estímulos. Nestas análises foi utilizado o método auto-regressivo. O motivo da adoção deste método paramétrico para estimação de densidade espectral de potência e coerência, ao invés de método baseado em transformada de Fourier, é o curto trecho analisado de somente 250 pontos amostrais.

Densidade espectral de potência:

Com o uso de métodos espectrais (densidade espectral de potência e coerência), não se evidenciou diferenças significativas de resposta neural ao pareamento do tom de 6kHz com a estimulação do NBM nos ratos pareados (CIRO e DITO). Nas figuras seguintes, tanto de ratos pareados como não-pareados, as estimativas espectrais da resposta ao tom de 6kHz estão destacadas em linha azul mais espessa.

Nas quatro figuras seguintes, os gráficos de densidade espectral de potência do córtex auditivo primário (A1) estão em organização matricial 3 linhas por 2 colunas. A coluna da esquerda estão as estimativas espectrais do período antes do treinamento (identificados “**teste0**”) e à direita após as quinze sessões de treinamento com estimulação sonora e elétrica de NBM (“**teste1**”).

Na primeira linha, estão as médias das estimativas espectrais calculadas para segmentos de 500 ms, sem sobreposição, em um trecho de 4,0 s, anterior ao início do sinal do estímulo sonoro. Foram promediadas as tentativas válidas (de acordo com a análise de estado e a qualidade do sinal), gerando um máximo de 15 tentativas por frequência de estimulação sonora.

Espectro de potência - Canal:A1e

Figure 19. Gráficos de densidades espectrais de potência do rato pareado DITO. As estimativas de diferentes frequências são praticamente iguais. Observa maior amplitude de resposta ao tom de 6 kHz porém, isso ocorre no período pré-treinamento, portanto de maneira fortuita e provavelmente em decorrência do pequeno número de tentativas válidas usado para sua estimativa.

Figure 20. Gráficos de densidade espectral de potência do rato pareado (CIRO) antes e após o treinamento para A1e. De maneira geral, observa-se maior variabilidade das estimativas de DEP devido ao menor número de tentativas válidas, mas não se observou exacerbação ou mudança significativa de resposta ao tom de 6 kHz (linha azul espessa) no período pós-treino (coluna da direita).

Figure 21. Densidade espectral de potência do rato não-pareado CÉSAR dos sinais do córtex auditivo primário (A1). Observa-se aparentemente resposta significativamente diferente ao tom de 6 kHz na coluna da direita, mas neste rato não se pareou o tom de 6kHz com o estímulo elétrico do NBM. Por outro lado há marcada flutuação de resposta para as diferentes frequência de tons. Um dos motivos foi um melhor número de tentativas válidas consideradas.

Coerência espectral quadrática

Para os mesmos grupos de ratos em que se calculou, nas quatro figuras anteriores, a densidade espectral potência, mostraremos a função de coerência espectral quadrática entre os registros eletrocorticográficos obtidos em A1 e M1. O procedimento de cálculo de médias e promediações bem como os critérios de seleção de trechos para análise são os mesmos adotados para a estimativa das densidades espectrais de potência.

O arranjo matricial dos gráficos de coerência, quanto aos períodos pré e pós-treinamento, assim como quanto ao momento em relação à apresentação do estímulo sonoro que usaremos nas Figuras 22 a 25, é o mesmo adotado para os gráficos de densidade espectral de potência mostrados nas Figuras 18-21.

Figure 22. Gráficos de coerência espectral quadrática entre M1 e A1 do rato não-pareado CAIO. Cada linha representa a estimativa de coerência para cada uma das frequências de tons considerados; novamente a estimativa correspondente ao tom de 6 kHz está em destaque. Não se nenhuma diferença significativa de estimativas de coerência espectral entre os vários trechos ou entre as duas condições antes e após o treinamento.

Figure 23. Coerência espectral quadrática do rato pareado CIRO. Não se observa diferença significativa da resposta ao tom de 6 kHz (traçado azul) pós-treinamento.

Figure 24. Coerência espectral quadrática do rato não-pareado DALTON. Os padrões da coerência espectral são similares entre as várias condições de registro.

Figure 25. Coerência espectral quadrática do rato pareado DITO. Novamente não se observa qualquer efeito do pareamento no treinamento da estimulação elétrica do NBM com o tom de 6 kHz.

Como se pôde constatar, não se evidenciou qualquer efeito específico do pareamento do estímulo elétrico do NBM e o tom de 6 kHz por meio da análise espectral dos potenciais de campo local do córtex auditivo primário. Observa-se, por exemplo, aumento no componente gama ao estímulo sonoro, mas é uma resposta inespecífica ao som que não se alterou com o treinamento.

Relação entre frequência cardíaca e EnAm do potencial de campo local do córtex.

Segundo Weinberger a alteração da frequência cardíaca é um indicativo indireto de ocorrência de alguma alteração fisiológica no sistema nervoso associado ao seu protocolo de aprendizado. De fato, a ausência de um marcador comportamental torna necessária a observação de outros parâmetros que sejam correlacionados com o estado do animal.

A dificuldade de se basear em tais parâmetros se deve à sua inespecificidade em relação ao fenômeno de interesse, exigindo o controle rigoroso de múltiplos fatores confusores. Uma possível amenização dessa situação pode ser obtida se mais de um parâmetro correlacionado fosse obtido para o mesmo fenômeno de interesse.

Nesse contexto, torna-se interessante o cálculo da EnAm, uma vez que este estaria relacionado com o “estado” do animal, ou mais especificamente, do sistema.

Dessa forma, procurou-se nesse trabalho verificar se a alteração do EnAm estaria correlacionado com a alteração da frequência de batimento cardíaco induzido pelo estímulo sonoro, uma vez que ambos estariam correlacionados com estado do animal.

O cálculo simples da correlação entre o EnAm e da frequência de batimento cardíaco de todos os dados mostrou ausência correlação entre essas medidas. Uma inspeção cuidadosa dos dados na pré-análise mostrou que os ratos, durante a exposição aos estímulos sonoros e elétrica de NBM, oscilavam entre os estados de sonolência e alerta. Um possível confusor poderia ser então a mistura de dados de animais em estados muito distintos.

Para verificar essa hipótese todos os segmentos de registros foram submetidos a um estagiamento comportamental cuidadoso e calculou-se novamente a correlação entre a alteração n EnAm e frequência cardíaca e dessa vez obteve-se uma correlação linear significativa entre as duas quantidades.

Análise da frequência cardíaca

Neste experimento, caracterizou-se as respostas cardíacas à apresentação de tons puros em ratos. Estudou-se as alterações destas respostas após repetida estimulação do NBM em concomitância com a apresentação dos tons, verificando

também a existência de efeitos duradouros nas respostas autonômicas para estes estímulos (neste caso, batimentos cardíacos). Analisou-se também a diferença entre as respostas para grupos que receberam a estimulações pareadas e não-pareadas ao tom de 6 kHz.

Resposta cardíaca à apresentação de tons

Em todos os animais estudados, observou-se claramente o efeito da estimulação sonora sobre a frequência de batimentos cardíacos. No trecho da Figura 26 observa-se batimento cardíaco que cursa com nítido aumento para cada uma apresentação dos estímulos sonoros de até 40 bpm acima do nível basal.

Figura 26. Gráfico de variação da frequência cardíaca (em batimentos por minuto) à apresentação de estímulos sonoros individuais (as frequências instantâneas foram calculadas a partir de um trecho contíguo de uma sessão anterior ao treinamento). O primeiro traçado tem duração de 200 segundos e várias apresentações de tons. O gráfico inferior corresponde ao trecho em destaque acima em que ocorre uma estimulação (a flecha indica o início do estímulo sonoro que tem 2 s de duração).

O formato característico da resposta relatado na literatura pode ser evidenciado pelas promediação de diversos testes de uma mesma sessão, vide Figura 27.

Figura 27. Frequência cardíaca instantânea média antes e depois da apresentação de um tom (marcada com a flecha). A média foi obtida a partir dos potenciais evocados em cada teste

O desenvolvimento da curva evocada é bastante consistente e é semelhante a resultados apresentados anteriormente por outros pesquisadores (Weinberger, 2007).

Em diversos registros, não se observou o efeito do aumento da frequência cardíaca, ou foi diminuto frusto. Verifica-se que a variação discreta da frequência cardíaca tem relação. Observou-se uma intensa correlação entre a frequência de batimento cardíaco nos instantes que antecedem o estímulo (variável que reflete o estado interno dos ratos) e a amplitude do aumento da frequência instantânea.

Figure 28. O gráfico mostra a relação entre a frequência cardíaca nos instantes que antecedem a apresentação do som e a amplitude do efeito observado. Este gráfico contém dados obtidos antes do treinamento. Na confecção do gráfico foram considerados os testes que possuíram boa leitura dos batimentos cardíacos. Cada ponto corresponde a um teste.

Este resultado não é surpreendente, uma vez que há um limite superior (físico) para a taxa de batimento cardíaco mas, como visto nesta figura, este é muito importante e deve ser levado em consideração na interpretação dos resultados.

Observações gerais

De acordo com o desenvolvimento temporal da curva evocada, definimos três intervalos para totalização e análise estatística dos resultados com relação ao momento da apresentação do estímulo sonoro (pré-estímulo , estímulo e pós-estímulo).

O período "pré-estímulo" foi definido arbitrariamente e nestas análises engloba os 4 segundos que antecedem o tom. O período "estímulo" coincide com os 2 segundos de duração do som. O período "pós-estímulo" dura 4 segundos, intervalo suficiente para englobar parte do aumento da taxa cardíaca que se segue à estimulação.

Note-se que os intervalos entre testes foram espaçados em mais de 30 segundos, para garantir que o efeito do aumento da taxa cardíaca após a estimulação não interfira com o teste seguinte.

Foram comparadas, para cada grupo, as amplitudes das respostas para as situações pré-treino e pós-treino. Com isso, buscou-se verificar se o treinamento produzia alterações nos padrões de resposta. Houve mudança significativa para o grupo não-pareado (Teste t, $p < 0,05$, com aumento da média) e houve mudança significativa para o grupo pareado (Teste t, $p < 0,05$, com redução da média). Este resultado é contrário ao esperado, uma vez que a literatura descreve que o pareamento produz respostas aumentadas (podendo inclusive ser generalizadas para todas as frequências (Weinberger, 2007) e que o grupo "não-pareado" não apresenta aumento das respostas.

Parte desta discordância pode ser esclarecida considerando-se a magnitude absoluta das frequências. Como assinalado anteriormente, há uma maior flutuação da frequência (correspondente a maiores picos na resposta cardíaca evocada) em ratos que possuem uma menor frequência cardíaca base.

Figura 29. Os dois gráficos acima mostram as médias dos efeitos da estimulação sonora após o treinamento. O primeiro gráfico são de animais não-pareados e o de baixo, pareados. No primeiro caso, não há preferência pela frequência apresentada durante o treinamento. No segundo caso, há uma aparente preponderância da resposta ao estímulo de treino (6kHz). Número de indivíduos: 2 para pareados e 5 para não pareados. Número de testes considerados estão indicados entre parênteses ao lado das frequências.

Nas primeiras sessões, as frequências cardíacas médias são bastante superiores àquelas observadas nas sessões subsequentes (inclusive a de teste). O teste pré-treino foi feito quando do primeiro contato dos ratos com o ambiente de registro. Neste caso, as altas frequências cardíacas são compatíveis com respostas autonômicas dos ratos apresentados a um novo ambiente e eliciando possivelmente experiência de medo e insegurança.

A curva de resposta cardíaca é extremamente sensível à taxa basal do batimentos cardíacos, assim, a resposta dos primeiros testes (medida como a variação sobre a taxa basal), apresenta-se bastante reduzida nestas situações. Desta forma, o aumento significativo das respostas dos animais não-pareados pode ter sido fruto da diferença da taxa cardíaca basal, que pode ter mascarado o efeito nos testes pré-treino.

Os animais pareados apresentaram frequências cardíacas menos elevadas durante o teste pré-treinamento. Desta forma, as respostas cardíacas ao som puderam alcançar uma maior amplitude inicial. Além disso, o número baixo de testes válidos (poucos animais) diminuiu o poder e utilidade dos testes estatísticos. Estes fatores combinados, podem explicar a redução da taxa média e a existência do aumento pós-treinamento para o tons que não o de treino (6 kHz). A ausência de alteração para as demais frequências é compatível com os relatos da literatura.

Discussão

Animais analisados

Após a padronização do protocolo com experimentos pilotos, realizou-se um total de 12 ratos, metade em cada um dos grupos, pareado e não-pareado. Completou-se todo protocolo experimental, i.e. implante de eletrodos, registros, treinamento comportamental e histologia, em nove ratos. Destes, quatro ratos eram do grupo de estímulos pareados e cinco de não-pareados. Como se pode constatar na Tabela 1, em dois dos quatros animais do grupo pareado, não se acertou a localização correta dos eletrodos de registro e/ou de estimulação. Da mesma forma, dos cinco ratos do grupo não-pareado, três foram efetivamente aproveitados.

Outro aspecto delicado, do qual nos conscientizamos durante a condução e na análise posterior dos dados, foi a constatação do pequeno número de repetições a que os ratos eram submetidos para cada categoria de estímulo sonoro por sessão. Cada frequência de tom puro é repetida somente 15 vezes, a partir do que se tenta estimar, pela promediação, os vários indicadores pela análise dos sinais eletrofisiológicos registrados. Estatisticamente, o número de 15 amostras é considerado pequeno. No caso de haver descartes de tentativas por presença de ruídos, artefatos nos registros ou por comportamento inadequado no momento da estimulação, as amostras são ainda mais reduzidas. A variabilidade marcante observada sistematicamente pode ser atribuída, ao menos em parte, a essa característica do protocolo. A longa duração das sessões limita, pelas alterações nas respostas por habituação e fadiga dos animais, o número de amostras que se pode colher. Daí a importância do extremo controle na condução dos experimentos para redução dos descartes de tentativas.

Outra constatação importante foi que o efeito e também a indução do aprendizado pela estimulação do NBM pareado à apresentação de um tom específico não parece ser um fenômeno biologicamente robusto. Como é descrito na séries de trabalhos do grupo de Weinberger, é necessário garantir um rigoroso, e às vezes exagerado, controle de uma séries de parâmetros e procedimentos.

As checagens e controles de efetividade do estímulo elétrico do NBM e do estímulo sonoro mostraram que o protocolo experimental e a escolha dos diversos parâmetros foram adequados, pois foram constatados os efeitos eletrofisiológicos esperados e relevantes descritos na literatura.

Como bônus e necessidade, uma série de rotinas computacionais específicas de análise dos registros eletrofisiológicos para protocolos relacionados a eventos foram implementados e testados durante a análise dos dados deste trabalho, podendo-se constatar sua versatilidade, poder e utilidade nesse protocolos experimental bastante complexo. O conjunto de rotinas em MATLAB hoje disponível, viabiliza que em próximos experimentos, a análise de dados seja realizada imediatamente após o experimento, permitindo checar no mesmo dia da coleta de dados a qualidade do registro, adequação do protocolo, bem como monitorar dia-a-dia a evolução do animal no protocolo de treinamento. Isto permitirá detectar rapidamente eventuais problemas ou falhas, ou mesmo achados científicos interessantes.

A análise espectral baseada em estimadores paramétricos, com o uso de modelo auto-regressivo, mostrou ser útil e sensível, por exemplo, para detectar o componente gama evocado pelo estímulo sonoro. Uma das virtudes dos métodos paramétricos de estimação espectral é proporcionar alta resolução temporal conveniente para análise de sinais não-estacionários, ou seja, registros de animais que observa mudanças rápidas e frequentes de estado ou que estejam engajados em protocolos relacionados a evento. A maior resolução temporal do método de análise espectral baseado em modelagem paramétrica permite detectar mudança de estado na escala de centenas de milissegundos, contrastando com métodos baseados em transformada de Fourier que requer em geral segmentos de sinais dez vezes mais longos.

Efeito sobre o batimento cardíaco

A apresentação estímulos ou eventos comportamentalmente relevantes é acompanhada de respostas autonômicas como, por exemplo, o aumento da frequência cardíaca. Considera-se que a magnitude da resposta está correlacionada à relevância e/ou intensidade do evento e estímulo. No caso da apresentação de sons para um animal, os mais relevantes deveriam elicitar aumentos mais significativos de taxa de batimentos cardíacos. Em experimentos de condicionamento aversivo sonoro, por exemplo, os sons anteriormente pareados ao estímulo aversivo, ainda que apresentados isoladamente, provocam acréscimo na frequência cardíaca.

Neste experimento, caracterizou-se as respostas cardíacas à apresentação de tons puros em ratos. A relevância comportamental é dada pela estimulação do NBM concomitante com a apresentação dos tons, verificando também a existência de efeitos

duradouros nas respostas autonômicas para estes estímulos (neste caso, batimentos cardíacos).

O controle comportamental das flutuações naturais do estado do rato durante o experimento é uma tarefa difícil, daí se explica, em parte, a grande flutuação das frequências cardíacas no período pré-estimulação (sessões com média próxima a 300 bpm e sessões em que a média se aproximava de 500 bpm). Em algumas ocasiões foram observadas variações de abrangência semelhante em uma mesma sessão. Do ponto de vista de análise, a inomogeneidade da amostra experimental representa um desafio. A dificuldade de comparação existe não somente para comparação intra-indivíduo e intra-grupo, mas também entre-grupos.

Para reduzir a variabilidade, os traçados eletrofisiológicos foram analisados visualmente, sendo descartados testes em que os ratos apresentassem estado de vigília relaxada ou sono. Ainda para viabilizar a análise e maximizar o número de dados utilizáveis foram adotadas, além da análise visual, métodos automatizados comumente usados em procedimentos de pré-processamento de dados em análise estatística. Por exemplo, as médias da frequência cardíaca foram obtidas a partir das medidas individuais, sendo descartados apenas os pequenos trechos das tentativas em que o eletrocardiograma apresentava dificuldades para a leitura.

A literatura indica que a estimulação pareada do núcleo basalis durante o treino induz alterações plásticas no sistema nervoso, que se refletem em respostas aumentadas para o tom ao qual o animal é exposto no treino (animais pareados apenas). Esta resposta seria maior do que aquela observada para outras frequências de tons em animais pareados e para qualquer frequência em animais para os quais os tons foram apresentados sem pareamento temporal.

Os animais não-pareados, em concordância com a literatura, não apresentam preferência pelo tom de 6 kHz (apresentado durante o treino). Os animais pareados, mostram uma resposta superior à média durante o intervalo pós-estímulo para os 6 kHz (t-test, $p < 0,05$). No entanto, outras frequências (2 e 15 kHz) também apresentaram diferenças significativas com relação à média, demonstrando aparente inespecificidade. A literatura aponta que em casos de estimulação com baixas correntes, o efeito do pareamento pode tornar-se inespecífico. A amperagem foi estimada a partir da avaliação da impedância dos eletrodos e do conhecimento da voltagem do estimulador. Não houve, no entanto, controle da amperagem efetivamente aplicada durante os experimentos. Pode haver aí um fator adicional de

variabilidade com relação à literatura, e mesmo entre diferentes animais. Cabe lembrar novamente que o número de tentativas por animal é pequeno e, portanto, não são possíveis conclusões definitivas sobre a especificidade da resposta pós-treino.

Embora haja padrões discrepantes de respostas de batimentos cardíacos ao estímulo sonoro tanto no grupo pareado como no não-pareado, observou-se respostas bastantes claras, vide Figura 27, em que a promediação do batimento cardíaco sincronizado do estímulo sonoro apresenta evidente curva de variação da frequência cardíaca similar ao reportado por Weinberger. Observa-se claramente uma resposta bi-fásica, ou seja, uma ligeira diminuição da frequência cardíaca seguida de persistente e prolongado aumento com duração aproximada de 15 s. Este mesmo fenômeno também pôde ser observado tentativas únicas (vide Figura 26) em que se pôde evidenciar claramente o aumento da frequência cardíaca à apresentação de estímulo único, individualmente.

Como pode ser visto na Figura 29, no período pré-condicionamento o aumento da frequência cardíaca ao estímulo sonoro foi inespecífico às frequências de estimulação (figura superior), porém, após o treinamento do pareamento da estimulação do NBM com tom de 6 kHz, observou-se na média de dois ratos extinção do aumento da frequência cardíaca para a maioria dos tons não-pareado (figura inferior). Isto é um interessante indício de que nossos achados corroboram com os trabalhos do grupo de Weinberger, embora a casuística seja insuficiente para tirarmos conclusões definitivas.

Conclusões

A estimulação elétrica do NBM induziu marcada e duradoura dessincronização da atividade elétrica do córtex cerebral, mais evidente no córtex auditivo primário e em menor grau na área motora primária, constatada pela diminuição da amplitude e também pela estimativa da densidade espectral de potência.

Em ratos sem exposição prévia ao estímulo elétrico ou sonoro observou-se marcado aumento transitório da frequência cardíaca para todas as frequências de tons testados. Em alguns ratos, observou-se um padrão bifásico, em que inicialmente observa-se ligeira diminuição, seguida de marcado aumento, como reportado na literatura.

As médias de dois ratos do grupo pareado parecem corroborar os relatos da literatura, em que o aumento da frequência cardíaca somente é preservado para aquela frequência do tom que foi pareada com o estímulo elétrico do NBM.

Na monitoração do padrão espectral antes, durante e após apresentação do estímulo sonoro, observou-se marcado aumento do componente na faixa da frequência do gama, principalmente no período imediatamente após a apresentação. Ou seja não houve alteração significativa do padrão espectral para o tom de 6 kHz pareado com a estimulação de NBM.

Da mesma forma, não se observou alteração do padrão da coerência espectral, mostrando que a alteração plástica neste paradigma experimental não parece ser acompanhada de alteração da conectividade funcional do cérebro.

Referências Bibliográficas

Bakin JS, South DA, Weinberger NM. Induction of receptive field plasticity in the auditory cortex of the guinea pig during instrumental avoidance conditioning. *Behavioral Neuroscience*. 1996b;110:905-13.

Bakin JS, Weinberger NM. Classical conditioning induces CS-specific receptive field plasticity in the auditory cortex of the guinea pig. *Brain Research*. 1990;536:271-86.

Bakin JS, Weinberger NM. Induction of a physiological memory in the cerebral cortex by stimulation of the nucleus basalis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1996a; 93:11219-24.

Brown MC. Audition. In: Zigmond M.J.e.c. (ed): *Fundamental Neuroscience*. San Diego: Academic Press; 1999.

Buonomano D, Mezernich MM. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annual Review of Neuroscience*. 1998;21:149-86.

Catania AC. *Learning*. ed 3a edição, New Jersey: Prentice Hall; 1992.

Detari L, Vanderwolf CH. Activity of identified cortically projecting and other basal forebrain neurones during large slow waves and cortical activation in anaesthetized rats. *Brain Research*. 1987;437:1-8.

Dringenberg HC, Rubenstein ML, Solty H, Tomaszek S, Bruce A. Electroencephalographic activation by tacrine, deprenyl, and quipazine: cholinergic vs. non-cholinergic contributions. *Eur J Pharmacol*. 2002;447:43-50.

Edeline JM, Maho C, Hars B, Hennevin E. Non-awaking basal forebrain stimulation enhances auditory cortex responsiveness during slow-wave sleep. *Brain Research*. 1994;636:333-7.

Fisahn A. Cholinergic activation and tonic excitation induce persistent gamma oscillations in mouse somatosensory cortex in vitro. *Trends of Pharmacological Science*. 1998;26:578-86.

Gritti I, Henny P, Galloni F, Mainville L, Mariotti M, Jones BE. Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters. *Neuroscience*. 2006;143:1051-64.

Hotta H, Uchida S, Kagitani F. Effects of stimulating the nucleus basalis of Meynert on blood flow and delayed neuronal death following transient ischemia in the rat cerebral cortex. *Jpn J Physiol*. 2002;52:383-93.

Jenkins WM, Merzenich MM. Neocortical representation dynamics in adult primates: implications for neuropsychology. *Neuropsychologia*. 1990;28:573-84.

Jones BE (ed). *Reticular formation: Cytoarchitecture, transmitters, and projections*. New York: Academic Press. ; 1995.

Kilgard MP, Merzenich MM. Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity. *Science*. 1998;279:1714-8.

Kramer MA, Chang FL, Cohen ME, Hudson D, Szeri AJ. Synchronization measures of the scalp electroencephalogram can discriminate healthy from Alzheimer's subjects. *International Journal of Neural Systems*. 2007;17:1-9.

Lee MG, Hassani OK, Alonso A, Jones BE. Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci*. 2005;25:4365-9.

Lehmann J, Nagy JI, Atmandja S, Fibiger HC. The nucleus basalis magnocellularis: The origin of cholinergic projection to the neocortex of the rat. *Neuroscience*. 1980;5:1161-74.

McLin DE, 3rd, Miasnikov AA, Weinberger NM. Induction of behavioral associative memory by stimulation of the nucleus basalis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002a;99:4002-7.

McLin DE, 3rd, Miasnikov AA, Weinberger NM. The effects of electrical stimulation of the nucleus basalis on the electroencephalogram, heart rate, and respiration. *Behav Neurosci*. 2002b;116:795-806.

Mesulam MM. The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Progress in Brain Research*. 2004;145:67-78.

Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*. 1983;10:1185-201.

Metherate R, Ashe JH. Basal forebrain stimulation modifies auditory cortex responsiveness by an action at muscarinic receptors. *Brain Res*. 1991;559:163-7.

Metherate R, Cox CL, Ashe JH. Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine. *J Neurosci*. 1992;12:4701-11.

Metherate R, Cox CL, Ashe JH. Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine. *Journal of Neuroscience*. 1992;12:4701-11.

Miasnikov AA, McLin DEI, Weinberger NM. Muscarinic dependence of nucleus basalis-induced conditioned receptive field plasticity. *Neuroreport*. 2001;12:1537-42.

- Montero-Pastor A, Vale-Martinez A, Guillazo-Blanch G, Marti-Nicolovius M. Effects of electrical stimulation of the nucleus basalis on two-way active avoidance acquisition, retention, and retrieval. *Behav Brain Res.* 2004;154:41-54.
- Moriizumi T, Hattori T. Separate neural populations of the rat globus pallidus projecting to the subthalamic nucleus, auditory cortex and pedunculopontine tegmental area. *Neuroscience.* 1992;46:701-10.
- Moucha R, Kilgard MP. Cortical plasticity an rehabilitation. *Prog Brain Res.* 2006;157:111-22.
- Ohl FW, Wetzel W, Wagner T, Rech A, Scheich H. Bilateral ablation of auditory cortex in Mongolian gerbil affects discrimination of frequency modulated tones but not of pure tones. *Learning and Memory.* 1999;6.
- Paxinos G, Watson G. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* ed 5a edição, San Diego: Academic Press; 2005.
- Saper CB. Brain stem modulation of sensation, movement, and consciousness. In: Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. (eds). *Principles of neuroscience.* international edition: McGraw-Hill; 2000, 889-909.
- Semba K. Phylogenetic and ontogenetic aspects of the basal forebrain cholinergic neurons and their innervation of the cerebral cortex. *Prog Brain Res.* 2004;145:3-43.
- Szymusiak R, Alam N, McGinty D. Discharge patterns of neurons in cholinergic regions of the basal forebrain during waking and sleep. *Behav Brain Res.* 2000;115:171-82.
- Szymusiak R, McGinty D. Sleep suppression following kainic acid-induced lesions of the basal forebrain. *Exp Neurol.* 1986;94:598-614.
- Weinberger NM. Physiological memory in primary auditory cortex: Characteristics and mechanisms. *Neurobiology of Learning and Memory.* 1998;70:226-51.
- Weinberger NM. Auditory associative memory and representational plasticity in the primary auditory cortex. *Hearing Research.* 2007;229:54-68.
- Wenk GL, Cribbs B, McCall L. Nucleus basalis magnocellularis: optimal coordinates for selective reduction of choline acetyltransferase in frontal neocortex by ibotenic acid injections. *Exp Brain Res.* 1984;56:335-40.
- Yakel JL, Shao Z. Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat hippocampal interneurons. *Prog Brain Res.* 2004;145:95-107.

Anexo 1:

Medidas de impedância do eletrodo de estimulação

Após o término dos experimentos, mediu-se a impedância para o eletrodo de estimulação dentro de cada animal devido às pequenas variações possíveis na fabricação do eletrodo. Por uma estimulação idêntica a do protocolo comportamental (vide acima em: Procedimentos do condicionamento clássico ao som de 6 kHz) pode-se inferir cada impedância e à partir delas calcular-se a corrente elétrica de estimulação. Para isso, utilizou-se um osciloscópio, o aparelho estimulador elétrico e um resistor de 100 kΩ. O seguinte circuito foi montado, por meio do qual se calculou a impedância do eletrodo no rato:

Legenda:

Amplitude da voltagem do estimulador (9V)

Z (impedância do eletrodo de estimulação no rato a ser determinado)

R resistor de 100 kΩ

Osciloscópio

Utilizou-se a equação

$$V_{\text{osciloscópio}} = \frac{R \times V_{\text{estimulador}}}{R + Z} \Rightarrow Z = \frac{R \times (V_{\text{estimulador}} - V_{\text{osciloscópio}})}{V_{\text{osciloscópio}}}$$

para se determinar a impedância **Z** do eletrodo de estimulação, com acréscimo de 33 kΩ para compensar a atenuação de saída do estimulador.

A impedância média foi de 105,8±22,8 kΩ@1 kHz e a corrente estimulação média de 90,3 μA (máxima de 108,4 μA e mínima de 70,0 μA) na extremidade dos eletrodos de estimulação.