

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica



João Pedro Carvalho Moreira

**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DO PROCESSO ICTAL POR MEIO DE AMOSTRAS
VETORIAIS DE CAMPO ELÉTRICO**

Belo Horizonte
2025

João Pedro Carvalho Moreira

**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DO PROCESSO ICTAL POR MEIO DE
AMOSTRAS VETORIAIS DE CAMPO ELÉTRICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

Belo Horizonte
2025

M838a

Moreira, João Pedro Carvalho.

Avaliação da dinâmica do processo ictal por meio de amostras
vetoriais de campo elétrico [recurso eletrônico] / João Pedro Carvalho
Moreira. – 2025.

1 recurso online (229 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Márcio Flávio Dutra Moraes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Engenharia.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia elétrica – Teses. 2. Epilepsia do lobo temporal –
Teses. 3. Eletrofisiologia – Teses. 4. Eletroencefalografia – Teses.
5. Circuitos neurais – Teses. I. Moraes, Márcio Flávio Dutra.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia.
III. Título.

CDU: 621.3(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Engenharia

COLEGIADO DO CURSO DE GRADUAÇÃO / PÓS-GRADUAÇÃO EM Engenharia Elétrica

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Avaliação da Dinâmica do Processo Ictal por Meio de Amostras Vetoriais de Campo Elétrico"

João Pedro Carvalho Moreira

Tese de Doutorado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

Aprovada em 04 de agosto de 2025.

Por:

Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes
DF (UFMG) - Orientador

Prof. Dr. Vinícius Rosa Cota
Dept Electronic Engineering (Maynooth University - Ireland)

Profa. Dra. Maria Elisa Calcagnotto
Departamento de Bioquímica - ICBS (UFRGS)

Prof. Dr. Adriano Tort
Instituto de Cérebro (UFRN)

Prof. Ph.D. Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes
DELTA (UFMG)



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Flavio Dutra Moraes, Professor do Magistério Superior**, em 11/08/2025, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano Bretanha Lopes Tort, Usuário Externo**, em 12/08/2025, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius Rosa Cota, Usuário Externo**, em 12/08/2025, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Elisa Calcagnotto, Usuário Externo**, em 14/08/2025, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Mazoni Andrade Marcal Mendes, Professor do Magistério Superior**, em 14/08/2025, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4414141** e o código CRC **2217392B**.

Aos meus pais e à minha irmã

AGRADECIMENTOS

Sempre me emociono em momentos de agradecimento, e certamente eu estava em um desses momentos enquanto escrevia este quase último suspiro de quatro anos e pouco. Uma vez me falaram que se emocionar era uma boa qualidade — e de fato é.

Parafraseando a música dos Novos Baianos: me joguei em BH, andei por alguns cantos e, pela lei natural dos encontros, eu deixei e recebi um tanto! Com certeza, a pessoa que iniciou não é exatamente a mesma que hoje completa a jornada.

Agradecer, para mim, é lembrar — e lembrar é bom!

Sempre me diziam que a educação era o maior bem que poderíamos carregar na vida. Que bom que eu tive pessoas que me ensinaram isso! Obrigado, pai e mãe, por me apoiarem e por me oferecerem educação e carinho. Eu acho que estamos no caminho certo. Admiro o que fizeram por mim e pela minha irmã, e me orgulho de vocês.

Lu, sempre bonita e brava, que bom compartilhar com você essa educação — e que saudade tenho do seu costumeiro carinho. Feliz por poder ver a sua caminhada.

Mãe, pai e Lu, como eu sinto saudade de vocês, de estar perto. Pelo menos a ligação semanal religiosa cumpriu o seu papel! Matava parte da saudade que apertava e também matava agonias e dúvidas. Me deram coragem, me deram opção, me deram muito amor. Obrigado!

A vocês três, dedico este nosso trabalho. Como é bom tê-los!

Sara, meu amor, o que que me aconteceu? Só você saberá me dizer... Você viu como foi! Me desorganizei, me perdi, me encontrei, me perdi de novo... Eu não dei conta, muita coisa ao mesmo tempo! Mas que bom que você nos aguentou firme. Sofreu comigo, me deu suporte, me suportou e me abraçou quando o desespero tomou conta. Nada como uma dança matinal pra me alegrar, um sorriso bobo... Me deu forças... É bom estar com você. Obrigado, meu bem!

Quando penso nos meus pais e no esforço que fizeram para que a minha trajetória fosse possível, penso automaticamente em todos que estiveram ao redor. Foi um apoio extenso, várias camadas de rede de apoio — sempre com muito afeto. Haja espelho para espelhar todos os bons exemplos.

Sô Paulito, vó Tereza, obrigado por tudo. “Acorda, menino! Tá na hora da escola” — e o toddy já estava até mexido. Da panela de miojo me salvaram, ô dia! Lembro do cafezinho com torta de sardinha nas tardes de pandemia. Colhe a couve na horta que domingo eu vou almoçar! Que saudade boa... Quem dera se a vida fosse fácil como é quando estou aí.

Agradeço também à minha vó Nicinha e, com muita saudade, me lembro do vô Inácio. A infância no sítio certamente era muito feliz!

Aos tios queridos, obrigado pelo incentivo, pela criação e pelos exemplos. Sofri com o Galo; do violão, às vezes eu tiro um “Drão”; quanto gosto musical pra escolher... Será que nota 7 no IMDB é o limite? Ganhei primos, ganhei uma afilhada, ganhei lares, ganhei diversão e ganhei

também muito amor. Me emociono — tive de onde puxar... Ainda bem que meu olho voltou pro lugar depois de rodar sem parar, para eu poder continuar vendo os exemplos e me espelhando...

Agradeço também aos meus primos queridos e aos demais familiares, e deixo um abraço especial para você, Gabrela, e para minha afilhada Bia.

Falar em família sem falar das Flechas é impossível. Quanto apoio eu tive de vocês e quantas boas lembranças! Otávio e Gabi sempre segurando as pontas, nos mantêm unidos, amigos fiéis, amigos amigos. Cola aí, Lameda, chama a Clarinha... Bora trocar uma ideia, falar aos ventos um bocado — sempre aprendo e me divirto muito. Cadê o Vini e a Luana? Devem estar em alguma festa nesse exato momento... Sabem aproveitar.

Passou rápido, rapaziada. Ainda ontem estávamos voltando em silêncio (sem levantar suspeitas) para a casa do Vini depois de alguma festa... Dormir com virol... É muita história, e eu as carrego sempre comigo...

Valeu, meus amigos! O próximo encontro é pra quando?

Motoca, meu caro, me lembro do dia em que voltei pra BH — você presente, igual sempre... Amigo fiel, estive por perto.

Bartô, o guerreiro apocalíptico, dono dos rolês intermináveis! Do Casulão ao Espanta Crise, muitas fases!

Michellini, meu parceiro de longa data.

A vocês, um grande abraço!

Deixo também meu agradecimento aos demais amigos que participaram desse processo: a galera da call, os amigos do colégio e da sub.

Mestre, me lembro da nossa primeira reunião, você já tinha um bocado de ideias para desenvolver. Eu, por outro lado, acho que ainda não entendia a metade das coisas ditas... mas era fascinante. Como assim, um vetor que mostra a atividade do cérebro? Quanto eu evoluí... Foram muitas conversas para tentar compreender (às vezes, não) coisas que pareciam óbvias para você... Um dom seu: enxergar o que não é óbvio, formular hipóteses e moldar experimentos com uma facilidade estranha. Vejo com muita admiração a sua vontade em fazer ciência, e me inspiro. Mais do que a orientação, você me ofereceu a amizade. Foi muito enriquecedor compartilhar contigo pontos de vista e ouvir com atenção sobre política, filosofia, religião — e as coisas de nerd também. Muito obrigado pela confiança e pela oportunidade!

Agradeço também à Grace e ao André, que muito contribuíram para o meu processo formativo. Foram muitos bons momentos no laboratório.

“Oi João, tudo bem? Passando pra saber como você está?” — mensagem do Mazoni, sempre atencioso, com uma modéstia irretocável! Para além de todas as ajudas burocráticas, você foi um grande amigo durante os anos de doutorado. Que bom foi poder contar contigo e jogar várias conversas fora. Obrigado pela assistência e pelas oportunidades. Guardo um carinho especial por você!

O NNC é um lar — e, como todo lar, é provido de muito afeto e proteção. Essa é uma conquista dos professores, e eu sou muito grato por isso. Sempre me senti bem, acolhido, como se estivesse em casa.

“Ô véio, vamos ali fumar um cigarro comigo.” É hora de parar um pouco. Colocar a cabeça no lugar. Chegou a vez do meu companheiro de dias malditos: Flavitcho! A voz de locutor de rádio com as orientações de como entrar no NNC Dark Side ainda ecoa na minha cabeça. Rasgando as madrugadas pandêmicas, montando setup e conversando de tudo um pouco. Eu ansiava a chegada das 15 horas. Aprendi muito sobre ciência, sobre o lab, sobre a vida — eram muitos assuntos. E que saudade! Muito obrigado, meu velho. Te admiro muito!

Não sei por que, mas só de falar em companheiro de dias malditos me vem o nome do Matheus à mente. Talvez seja pelos “dobrados que cortamos” juntos, como diria o Flávio. Ao som de “Se a resposta gera dúvida”, conversamos sobre um tanto de coisa, resolvemos problemas, trocamos teorias, trocamos experiências e confabulamos. Sempre parceiro. Valeu, meu mano Match.

Aos poucos o pessoal vai se juntando ao grupinho. Mas não existe grupo se não tiver a Paulitcha. Uniu as pessoas, inaugurou a copinha e fez tudo ficar mais leve. Se tornou a minha confidente, ouviu, acolheu e compartilhou comigo vários dos melhores momentos que tive no NNC. Obrigado pela amizade e por propiciar uma época tão boa no laboratório!

Arthur, o meu mano mais lúcido! Apreciador de um bom CS (que não é o brasileiro, óbvio). Qual será a teoria que vamos discutir hoje?

Harrison, que bom foi ouvir suas histórias, inimigando o fim na copinha, sempre ao som de uma boa e animada playlist.

Feliz, feliz, feliz! Na caneca, um café bem amargo; um filtro vermelho potente na mão e uma pitada de melancolia. Passamos horas traçando planos, executamos vários. Alguns deram certo, outros nem tanto... Reclamamos da vida um monte, mas o importante é que você esteve lá, comprou as minhas ideias, ofereceu oportunidades e ajudou muito! Obrigado, Léo!

JV, meu casca de bala. O exercício de escrever a tese foi um pouco mais complicado porque não tinha um Batatinha no meio de semana pra tranquilizar. Sempre feliz, positivo — você é um cara muito legal.

Um agradecimento especial ao mano Ed e ao mano Brinquedo Luiz, para vocês deixo a pergunta: quem tem mais, tem quantas? Também agradeço ao Lucas juvenil, mestre das caipirinhas e dos bons vinhos.

Apesar da rixa 240 x 168, queria deixar um agradecimento aos amigos da sala de lá... Beautifuls no plural, Lara Mansk, Bia e Flávia, obrigado por terem feito parte da minha trajetória, foram muitos bons momentos que vivemos. Júlia e Laura, boa sorte nessa caminhada, aproveitem muito o NNC!

Agradeço ao companheirismo do Thiago, que se fez presente com conversas interessantes e um humor único! E também ao meXXXtrão Evandro, que tomando café forte com uma tranquilidade costumeira, alegrou as tardes do laboratório com as suas famosas gargalhadas!

Ao John, mando um forte abraço e agradeço pela colaboração! Que sorte eu tive de poder contar com suas preciosas dicas (e foram muitas...).

Agradeço às ICs Letícia, Maria Eduarda, Sarah e Camila. E, em especial, à Enoy (para ela é ESPECIAL, em letras maiúsculas) e ao Arthur, que tiveram participação direta em alguns dos resultados deste trabalho. Deixo também um abraço para aquelas pessoas que conheci e compartilhei momentos durante minha trajetória no NNC.

Por fim, gostaria de reconhecer a contribuição de alguns professores que foram fundamentais para a minha trajetória.

Primeiramente, agradeço ao Prof. Vinícius Rosa Cota, que foi o responsável por me fazer apaixonado pelas neurociências. Vinícius, você não só me revelou todo um mundo de possibilidades, como também proporcionou a ponte para que eu conhecesse o Márcio. Obrigado por ter confiado em mim e ter enxergado o meu potencial.

Agradeço a Prof. Paula Bargi de Souza e o Prof. Rodrigo Antonio Peliciari-Garcia, que durante um ano trabalharam comigo no desenvolvimento do CircadiPy e se tornaram grandes parceiros. Aprendi muito durante esse processo, e alguns dos dados aqui apresentados foram frutos dessa colaboração.

Agradeço também à Prof. Lane Maria Rabelo Baccarini, ao Prof. Paulo Cezar Monteiro Lamim Filho, ao Prof. Gleison Fransoares Vasconcelos Amaral e ao Prof. Victor Rodrigues Santos, que

contribuíram para o desenvolvimento da minha carreira acadêmica. Por fim, agradeço aos demais professores que de alguma forma influenciaram a minha formação (SESI, CMBH, UFSJ e UFMG).

RESUMO

A epilepsia é uma doença que afeta cerca de 50 milhões de pessoas, constituindo um dos distúrbios neurológicos mais prevalentes no mundo. Como os mecanismos responsáveis pela propagação da crise nos circuitos neurais ainda não estão totalmente elucidados, a compreensão da dinâmica ictal é fundamental para o diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de modelos de previsão e prevenção das crises epiléticas. Neste trabalho, propôs-se o uso do Vector-EEG (*Vector-Electroencephalogram*), uma técnica de vetorização de registros eletroencefalográficos, para o estudo da dinâmica do recrutamento de circuitos neurais durante processos ictogênicos. A primeira etapa do estudo analisou padrões eletrográficos hipocampais sob influência de estímulos elétricos aplicados na amígdala basolateral, o que permitiu o estudo dos circuitos participantes do processo ictogênico em um modelo de crise generalizada. Os resultados indicaram que a estimulação da amígdala provoca um potencial evocado no hipocampo e que a rede neural é progressivamente acoplada aos estímulos. Demonstrou-se que o Vector-EEG apresenta características distintas do EEG convencional, permitindo a identificação de um estado de competição entre circuitos que antecede a crise eletrográfica, seguido pela dominância de um único circuito sincronizado à via facilitada pela estimulação. A segunda fase da tese investigou a diversidade e a dinâmica de ativação de circuitos envolvidos no *status epilepticus* em um modelo de epilepsia focal, com registros realizados bilateralmente nos hipocampus e amígdalas basolaterais. A aplicação do Vector-EEG revelou um repertório de circuitos mais amplo do que aquele obtido pela análise do EEG. Também foram identificados circuitos preferencialmente ativos em períodos específicos da crise, além de circuitos especializados em crises isoladas, indicando o aumento da complexidade da rede envolvida nos sucessivos eventos ictais. Este trabalho também descreve o desenvolvimento de um sistema de aquisição de sinais eletrofisiológicos de baixo custo, o MicroMAP, incluindo metodologias para montagem do conversor analógico-digital e para construção de implantes com múltiplas regiões cerebrais. O sistema constitui uma solução de baixo custo para registros eletrofisiológicos, com grande potencial para explorar processos epileptogênicos em experimentos paralelos de longa duração. Por fim, apresenta-se a biblioteca CircadiPy para análise de séries temporais cronobiológicas. Desenvolvida em Python, ela oferece um conjunto de ferramentas para a extração de dados rítmicos, como atividade locomotora, expressão gênica e temperatura corporal, importantes para o estudo sistêmico dos processos epileptogênicos.

Palavras-chave: Ictogênese; Vector-EEG; Eletrofisiologia; Circuitos neurais; Aquisição de sinais.

ABSTRACT

Epilepsy is a disease that affects approximately 50 million people, making it one of the most prevalent neurological disorders worldwide. Since the mechanisms responsible for seizure propagation across neural circuits are not yet fully understood, understanding ictal dynamics is essential for diagnosis, treatment, and the development of models for seizure prediction and prevention. In this work, we propose the use of Vector-EEG (Vector-Electroencephalogram), a technique for vectorization of electroencephalographic recordings, to study the dynamics of neural circuit recruitment during ictogenic processes. The first stage of the study analyzed hippocampal electrographic patterns under the influence of electrical stimulation applied to the basolateral amygdala, which enabled the investigation of circuits involved in the ictogenic process in a generalized seizure model. The results indicated that amygdala stimulation evokes a potential in the hippocampus and that the neural network is progressively coupled to the stimuli. We demonstrated that Vector-EEG displays characteristics distinct from conventional EEG, allowing the identification of a competitive state among circuits that precedes the electrographic seizure, followed by the dominance of a single circuit synchronized with the pathway facilitated by stimulation. The second phase of the thesis investigated the diversity and activation dynamics of circuits involved in status epilepticus in a focal epilepsy model, with bilateral recordings in the hippocampi and basolateral amygdalae. Application of Vector-EEG revealed a broader repertoire of circuits than that obtained through conventional EEG analysis. Circuits preferentially active during specific seizure periods, as well as circuits specialized in isolated seizures, were identified, indicating increasing network complexity across successive ictal events. This work also describes the development of a low-cost electrophysiological signal acquisition system, MicroMAP, including methodologies for assembling the analog-to-digital converter and constructing implants targeting multiple brain regions. The system provides a low-cost solution for electrophysiological recordings with great potential for exploring epileptogenic processes in long-term parallel experiments. Finally, we present CircadiPy, a Python library for the analysis of chronobiological time series. It offers a set of tools for extracting rhythmic data, such as locomotor activity, gene expression, and body temperature, which are important for systemic studies of epileptogenic processes.

Keywords: Ictogenesis; Vector-EEG; Electrophysiology; Neural circuits; Signal acquisition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vetorização de amostras de campo elétrico.....	52
Figura 2 - Desenho esquemático da construção de matrizes para registros de iEEG em múltiplas áreas.....	55
Figura 3 - Etapas do procedimento cirúrgico para implantação da matriz de eletrodos, exemplo representativo referente ao Protocolo 2.....	58
Figura 4 - Etapas do protocolo experimental 1.....	61
Figura 5 - Configuração dos eletrodos de registro das matrizes do protocolo experimental 1.....	63
Figura 6 - Etapas do protocolo experimental 2.....	64
Figura 7 - Configuração dos eletrodos de registro das matrizes do protocolo experimental 2.....	66
Figura 8 - Requisitos necessários para a leitura dos arquivos de iEEG.....	69
Figura 9 - Exemplo do processo de identificação de clusters de trajetórias de VEEG.....	72
Figura 10 - Processo de identificação e agrupamento de eventos ictais, exemplificado pelo Animal 004 do Protocolo 2.....	83
Figura 11 - Potencial evocado relacionado à estimulação elétrica da amígdala basolateral no período basal (antes da administração de PTZ).....	87
Figura 12 - Progressão do potencial relacionado ao estímulo durante o processo ictogênico.....	90
Figura 13 - Evolução do acoplamento neural ao estímulo registrado em diferentes etapas do protocolo.....	91
Figura 14 - Análise da dispersão angular dos vetores de VEEG, magnitude vetorial do VEEG e potência instantânea do iEEG para diferentes períodos do protocolo.....	92
Figura 15 - Análise da dispersão angular dos vetores de VEEG, magnitude vetorial do VEEG e potência instantânea do iEEG para diferentes períodos do protocolo e janelas relacionadas ao ERP.....	94
Figura 16 - Caracterização dos eventos de VEEG e dos clusters de trajetórias identificados.....	99
Figura 17 - Exemplo do processo de identificação de eventos e agrupamento de padrões.....	102
Figura 18 - Exemplo do processo de classificação de clusters.....	103
Figura 19 - Progressão do número de eventos, número de clusters e proporção de cluster com preferência de atividade em janelas da crise.....	105
Figura 20 - Clusters com preferência de atividade em períodos específicos referentes à dinâmica de cada crise.....	106
Figura 21 - Clusters com preferência de atividade em crises específicas. A classificação proposta é relacionada a cada uma das oito crises estudadas, numeradas aqui de 1 a 8.....	107
Figura 22 - Análise histológica para confirmação do posicionamento dos eletrodos e cânulas.....	109

Figura 23 - Visão geral do sistema MicroMAP.....	132
Figura 24 - Comunicação SPI.....	135
Figura 25 - Comunicação SPI dos chipsets RHD e ADS.....	136
Figura 26 - Circuito do headstage para chipsets da série ADS 129x.....	138
Figura 27 - Estrutura do MicroMAP.....	140
Figura 28 - Sinal dente de serra gerado pelo Arduino e registrado pelo MicroMAP para testar a comunicação entre os componentes (a amplitude é desprezível).....	142
Figura 29 - Resultados experimentais utilizando o RHD2000.....	146
Figura 30 - Validação do headstage e da aquisição de sinais de chipsets ADS1298.....	147
Figura 31 - Estrutura da biblioteca CircadiPy, figura retirada de Carvalho-Moreira (2024).....	161
Figura 32 - Comparação entre modelos produzidos a partir de dados do CircaDB, CircaInSilica e simulações do CircadiPy, figura retirada de Carvalho-Moreira (2024).....	173
Figura 33 - Saídas representativas da simulação do CircadiPy (simulação 9 com razão sinal-ruído de 5 dB), figura retirada de Carvalho-Moreira (2024)..	175
Figura 34 - Saídas representativas de um protocolo experimental real de longa duração utilizando o sistema IntelliCage, figura retirada de Carvalho-Moreira (2024).....	176
Figura 35 - Saídas representativas de um protocolo experimental real de longa duração utilizando o sistema ER4000 acoplado ao software de aquisição de dados VitalView® (exemplo extraído dos registros do animal 1).....	178

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenadas estereotáxicas para inserção dos eletrodos de registro e de estimulação, referentes ao protocolo experimental 1.....	61
Tabela 2 - Coordenadas estereotáxicas para inserção dos eletrodos de registro e da cânula guia do protocolo experimental 2.....	65
Tabela 3 - Comparação dos custos dos componentes necessários para a construção do sistema MicroMAP e dos componentes utilizados em outros sistemas de aquisição (atualizado em 29/04/2025).....	133
Tabela 4 - Características dos registros coletados.....	142
Tabela 5 - Configuração de capacitores e resistores do ADS1298 (design disponível no GitHub).....	144
Tabela 6 - Esquema das etapas de análise empregadas em cada abordagem metodológica para testar e validar as funcionalidades do CircadiPy.....	170

SÍMBOLOS E ABREVIações

AD	Amígdala direita
ADC	Conversor analógico-digital (do inglês, Analog-to-Digital Converter)
AE	Amígdala esquerda
API	Interface de Programação de Aplicações (do inglês, Application Programming Interface)
AP	Anteroposterior
CPCs	Clusters com preferência por crises específicas
CPJC	Clusters com Preferência por Janela da Crise
DBS	Estimulação cerebral profunda (do inglês, Deep Brain Stimulation)
DD	Escuro-escuro (do inglês, Dark-Dark)
DL	Escuro-claro (do inglês, Dark-Light)
DV	Dorsoventral
EE	Estimulação Elétrica
EEG	Eletroencefalograma
EKG	Eletrocardiograma
ELTM	Epilepsia de lobo temporal mesial
ERP	Potencial evocado relacionado ao evento (do inglês, Event-Related Potential)
FDR-BH	Taxa de Falsas Descobertas de Benjamini-Hochberg (do inglês, Benjamini-Hochberg False Discovery)
fMRI	Ressonância magnética funcional (do inglês, functional Magnetic Resonance Imaging)
FPGA	Arranjos de porta programável em campo (do inglês, Field Programmable Gate Array)
GUI	Interface gráfica do usuário (do inglês, Graphical User Interface)
HD	Hipocampo direito

HE	Hipocampo esquerdo
iEEG	Eletoencefalograma intracraniano
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia (do inglês, International League Against Epilepsy)
KA	Ácido Caínico (do inglês, Kainic Acid)
LD	Claro-escuro (do inglês, Light-Dark)
LFP	Campo de potencial elétrico local (do inglês, Local Field Potential)
LL	Claro-claro (do inglês, Light-Light)
LTP	Potencialização de Longo Prazo (do inglês, Long-Term Potentiation)
MEG	Magnetoencefalografia
MEP	Matriz de eletrodos profundos
MicroMAP	Micro Multichannel Acquisition Pack
ML	Médio-laterais
NaN	Não é um número (do inglês, Not-a-Number)
NNC	Núcleo de Neurociências
OE	Open Ephys
PA	Potencial de ação
PCBs	Placas de circuito impresso (do inglês, Printed Circuit Boards)
PTZ	Pentilenotetrazol
RAC	Receptores ionotrópicos de cainato
RNS	Estimulação neural responsiva (do inglês, Responsive Neural Stimulation)
RPi	Raspberry Pi
SCN	Núcleo supraquiasmático (do inglês, Suprachiasmatic Nucleus)
SE	Status epilepticus
SLA	Atividade locomotora espontânea (do inglês, Spontaneous Locomotor Activity)

SPI	Interface periférica serial (do inglês, Serial Peripheral Interface)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEEG	Vetor Eletroencefalograma (do inglês, Vector Electroencephalogram)
WTA	Ganhador Leva Tudo (do inglês, Winner-Take-All)
ZT	Tempo Zeitgeber (do alemão, Zeitgeber Time)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
CAPÍTULO I	25
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
1.1. Epilepsia.....	26
1.2. Ictogênese e epileptogênese.....	27
1.3. Lobo temporal.....	29
1.4. Modelos animais em estudos sobre epilepsia.....	31
1.5. Eletroencefalografia.....	32
1.6. Escalas espaciais e temporais de registros eletrofisiológicos.....	35
1.7. Vetorização de amostras de campo elétrico.....	37
1.8. Biomarcadores.....	39
1.9. Estimulação elétrica e potencial evocado por estímulo.....	41
1.10. Justificativa e organização do capítulo.....	44
2. OBJETIVO.....	47
2.1. Geral.....	47
2.2. Específico.....	47
2.2.1. Protocolo 1.....	47
2.2.2. Protocolo 2.....	48
3. METODOLOGIA.....	50
3.1. Cálculo do VEEG: amostras vetoriais de campo elétrico.....	50
3.2. Metodologia de construção de matrizes de eletrodos profundos.....	54
3.3. Animais e grupos.....	57
3.4. Cirurgia estereotáxica.....	57
3.5. Protocolo experimental 1 - PTZ.....	60
3.6. Protocolo experimental 2 - ácido caínico.....	64
3.7. Análise e processamento de sinais.....	67
3.7.1. Pacote de análise de iEEG.....	68
3.7.2. Pacote de análise de VEEG.....	70
3.7.3. Pacote de análise para identificação de trajetórias.....	70
3.7.4. Análise do Protocolo 1 - a dinâmica do ERP durante processo ictogênico.....	73
3.7.5. Análise do Protocolo 1 - identificação de circuitos por padrões de trajetórias.....	79
3.7.6. Análise do Protocolo 2.....	81
4. RESULTADOS.....	87
4.1. Protocolo 1.....	87
4.2. Protocolo 2.....	101
4.3. Histologia.....	108
5. DISCUSSÃO.....	110

6. CONCLUSÃO.....	122
CAPÍTULO II.....	124
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	125
2. OBJETIVO.....	130
2.1. Geral.....	130
2.2. Específico.....	130
3. METODOLOGIA.....	131
3.1. Códigos da interface gráfica e de controle da aquisição de sinais digitais.....	131
3.2. Construção dos headstages adaptados para os chipsets RHD e ADS.....	137
3.3. Design e fabricação da caixa para o MicroMAP.....	139
3.4. Validação das funcionalidades do controlador.....	141
3.5. Registro bioelétrico e validação do headstage adaptado RHD2000 utilizando o micromap.....	143
3.6. VALIDAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DO HEADSTAGE ADAPTADO PARA O ADS1298.....	144
3.7. Documentação.....	145
3.8. Disponibilidade dos dados.....	145
4. RESULTADOS.....	146
5. DISCUSSÃO.....	149
6. CONCLUSÃO.....	154
CAPÍTULO III.....	155
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	156
2. OBJETIVO.....	158
2.1. Geral.....	158
2.2. Específico.....	158
3. METODOLOGIA.....	160
3.1. Implementação.....	160
3.2. Dados obtidos do CircaDB.....	166
3.3. Dados simulados pelo CircaInSilica e pelo CircadiPy.....	166
3.4. Dados cronobiológicos adquiridos usando sensores de telemetria e IntelliCages.....	167
3.5. Rotina de análise.....	168
3.6. Documentação.....	171
4. RESULTADOS.....	173
5. DISCUSSÃO.....	179
6. CONCLUSÃO.....	183
REFERÊNCIAS.....	184

ANEXO I - Descrições Estatísticas Complementares.....	215
ANEXO II - Artigos Publicados.....	223
ANEXO III - Aprovação dos protocolos experimentais.....	225

INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma das condições neurológicas mais prevalentes e representa um desafio, tanto do ponto de vista diagnóstico quanto terapêutico. Dentre seus diversos subtipos, a epilepsia do lobo temporal mesial destaca-se por sua alta taxa de refratariedade ao tratamento farmacológico, o que torna especialmente relevante a busca por uma compreensão mais profunda dos mecanismos ictogênicos e epileptogênicos, além do estabelecimento de novas abordagens terapêuticas. A presente tese objetiva avançar na compreensão dos mecanismos ictogênicos, além de contribuir com o desenvolvimento de tecnologias e inovações em áreas relacionadas.

A Neurociência é multidisciplinar e a compreensão dos fenômenos neurais reside, em parte, na interseção entre a Biologia e as Engenharias. Se por um lado a primeira desvenda as estruturas e os mecanismos dos componentes do sistema nervoso, a segunda oferece o arcabouço teórico para medir, processar e decifrar a complexa dinâmica dos sinais neurais. Conceitos de teoria de controle, modelagem de sistemas e, fundamentalmente, processamento de sinais são indispensáveis para interpretar as flutuações de potencial de campo que caracterizam a função fisiológica.

Este trabalho representa um esforço de engenharia focado em um problema relevante da neurologia. A presente tese estrutura-se em três capítulos interconectados que abordam, sob diferentes perspectivas, os desafios da epilepsia por meio de aspectos que têm guiado o desenvolvimento científico brasileiro: ciência, tecnologia e inovação.

O primeiro capítulo (Capítulo I) constitui a primeira hipótese científica que escolhemos. Uma linha de pesquisa do orientador Prof. Márcio F. D. Moraes, onde aplica-se a técnica de amostragem vetorial de campo elétrico medido por eletroencefalograma (EEG), denominada Vector-EEG (VEEG), para investigar como os circuitos neurais se organizam durante o estado ictal. A hipótese geral é que, ao adicionar uma nova característica espacial aos registros, torna-se possível mapear os circuitos e revelar padrões ocultos ao EEG na dinâmica da rede. O estudo foi conduzido por duas óticas complementares, inicialmente estudando aspectos do processo ictogênico por meio do acoplamento neural à um estímulo exógeno e, em seguida, desvendando características de crises sucessivas durante o *status epilepticus*.

O segundo capítulo (Capítulo II) avança no eixo da tecnologia e nasce de uma característica do nosso laboratório (Núcleo de Neurociências - NNC, ICB, UFMG): o desenvolvimento de soluções sólidas e de baixo custo para incentivar e permitir a pesquisa em um ambiente onde o orçamento é tão escasso. Aqui, apresentamos o sistema MicroMAP, uma plataforma de aquisição de dados eletrofisiológicos, projetada para registrar múltiplos canais em animais com livre movimentação. Esta plataforma foi concebida para viabilizar estudos em epileptogênese sequenciais aos experimentos do Capítulo I. O sistema apresenta a capacidade de registrar o EEG de vários animais de forma paralela em experimentos longitudinais. Além disso, o sistema representa uma contribuição tecnológica independente para a comunidade científica interessada em registros eletrofisiológicos agudos e de longa duração.

Por fim, o terceiro capítulo (Capítulo III) é fruto do ambiente colaborativo e interdisciplinar do doutorado, mostrando que, ao longo desses anos, nosso grupo contribuiu com demandas não estritamente relacionadas à uma única pesquisa, algo importante para o desenvolvimento científico no geral. Nesse trabalho, junto ao grupo do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo (ICB, UFMG) desenvolvemos a biblioteca CircadiPy, com funções desenvolvidas em Python para a análise de séries temporais rítmicas. Essa biblioteca lida com grandes volumes de dados, como os potencialmente produzidos pelo MicroMAP e fornece uma base computacional para o estudo de padrões temporais. Nesse primeiro passo, abordamos ritmos circadianos, linha de pesquisa da Prof. Paula Bargi de Souza, com aplicações que podem abranger a cronobiologia e futuramente estudos longitudinais em epilepsia.

No conjunto, esta tese percorre um trajeto que começa pela pergunta científica, passa pela construção das ferramentas necessárias para respondê-la e culmina na criação de soluções de análise que expandem as possibilidades do campo. Sendo assim, ao explorar os mecanismos da epilepsia por meio dos VEEG, ao desenvolver sistemas acessíveis para a coleta de dados e ao propor métodos computacionais, este trabalho objetivou contribuir para o desenvolvimento científico nacional em diferentes aspectos.

CAPÍTULO I

Amostragem Vetorial De Campo
Elétrico Aplicada à Avaliação Da
Dinâmica Ictal

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Epilepsia

Crise epiléptica pode ser caracterizada pelo aumento anormal da atividade e do sincronismo de uma ou mais estruturas cerebrais (Cota et al., 2016). Um dos principais mecanismos relacionados à sua ocorrência é a desregulação de circuitos neuronais que possuem alças de retroalimentação negativa, cujo desequilíbrio do controle inibitório ocasiona um aumento na excitabilidade ou sincronismo (Scharfman, 2007). A susceptibilidade de crises pode estar relacionada a fatores genéticos, falhas no desenvolvimento, traumas, infecções, tumores, entre outros (Scharfman, 2007; World Health Organization, 2019).

De acordo com a International League Against Epilepsy - ILAE, a epilepsia é definida como uma doença caracterizada por: (1) ocorrência de ao menos duas crises epilépticas espontâneas, separadas entre si por, no mínimo, 24 horas, (2) uma crise espontânea com alto risco de recorrência, ou (3) diagnóstico de uma síndrome epiléptica (Fisher et al., 2014). Portanto, apesar da relação entre as definições de crise epiléptica e epilepsia, a ocorrência da primeira não necessariamente está atribuída à presença da segunda, sendo a espontaneidade e a recorrência dos eventos ictais, uma característica fundamental para o diagnóstico da doença.

A epilepsia é considerada uma das desordens neurológicas mais comuns no mundo e acomete cerca de 50 milhões de pessoas. A população com epilepsia possui aproximadamente três vezes mais risco de morte prematura em relação à população geral. Além disso, a população acometida frequentemente enfrenta consequências físicas, psicológicas e sociais que impactam significativamente sua qualidade de vida. Um outro aspecto agravante é a distribuição geográfica de pessoas afetadas pela doença, que aponta uma dominância de diagnósticos em países subdesenvolvidos, cuja disponibilidade de assistência médica em geral é mais precária (World Health Organization, 2019).

Do ponto de vista eletrofisiológico, a crise epiléptica é caracterizada como: (1) focal, quando o evento ictal ocorre em um dos hemisférios do

cérebro; (2) generalizada, quando o foco se origina rapidamente em circuitos bilaterais; (3) de origem indeterminada, quando não há uma definição quanto ao foco primário (Fisher et al., 2017; Scheffer et al., 2017). A epilepsia pode ser classificada por métricas semelhantes às enunciadas anteriormente, como focal, generalizada, combinada focal e generalizada (foco secundário) ou desconhecida (Scheffer et al., 2017).

Dentre uma enorme variedade de tipos de epilepsia, destaca-se a epilepsia de lobo temporal mesial (ELTM), por ser a mais prevalente e apresentar o maior percentual de pacientes farmacorresistentes (epilepsia refratária), cuja a intervenção cirúrgica se faz necessária em consequência do tratamento farmacológico ineficiente. A ELTM está associada às estruturas límbicas do lobo temporal, como o hipocampo e a amígdala, e pode gerar crises generalizadas secundárias, a partir dessas regiões.

Em geral, o desenvolvimento da condição epiléptica pode ser caracterizado por três etapas: (1) um insulto inicial; (2) um período silente de alterações moleculares e estruturais; e (3) o surgimento de crises espontâneas e recorrentes (Raedt et al., 2009). Na ELTM, o processo possui alta correlação com a presença de esclerose hipocampal, morte celular, brotamento de fibras musgosas, reorganização do circuito trissináptico hipocampal, gliose, dispersão de células granulares, entre outros fatores (Engel, 2001; Lévesque & Avoli, 2013; Raedt et al., 2009; Rusina et al., 2021).

A compreensão da dinâmica neural das epilepsias, em especial da ELTM, e dos mecanismos envolvidos na propagação de um foco epileptico, pode auxiliar na concepção de técnicas e modelos de previsão de crise e, conseqüentemente, na prevenção de eventos ictais, o que impacta de forma positiva e significativa na qualidade de vida dos pacientes.

1.2. Ictogênese e epileptogênese

Denomina-se ictogênese o processo pelo qual um cérebro em estado interictal passa a apresentar atividades ictais (crises epilépticas), por meio de alterações fisiológicas anormais nos mecanismos sinápticos, moleculares e/ou estruturais, como flutuações no limiar de disparo de potenciais de ação

neurais, desequilíbrio nas concentrações iônicas ou hiper sincronização de populações neurais.

O processo ictogênico pode ser descrito, de forma básica, pela presença de quatro tipos de circuitos: (1) regiões cerebrais susceptíveis ao surgimento de atividade anormal que originam um foco epilético, (2) circuitos necessários para a sustentação deste evento inicial, que são recrutados e efetivamente geram a crise, (3) circuitos interconectados que espalham a crise para outras regiões, e (4) circuitos externos ao(s) foco(s) primário(s) que modulam a excitabilidade dos diversos componentes de uma crise (Bertram, 2013).

Em uma escala temporal expandida, que pode variar de dias a anos, define-se epileptogênese como o processo pelo qual um cérebro saudável se torna epilético, cuja dinâmica envolve uma cascata de alterações fisiológicas e funcionais como morte neuronal, crescimento anômalo de ramificações axonais, falhas no desenvolvimento de novas sinapses, entre outros. Ainda, define-se epileptogenicidade um conceito atrelado à susceptibilidade de um cérebro a gerar uma crise de forma espontânea (Engel Jr, 2011).

Pode-se notar que as concepções dos fenômenos citados não são explicadas somente pelos eventos ictais, mas também pelas alterações que levam o cérebro a expressar tais características patológicas. Em outras palavras, os estados do sistema estão diretamente relacionados à sua dinâmica e, conseqüentemente, não devem ser analisados de maneira isolada.

De fato, crises epiléticas podem gerar alterações plásticas nas redes neurais subjacentes de modo a modificar circuitos, seus mecanismos de retroalimentação e até mesmo criar rotas de propagação da atividade anormal para outras regiões do cérebro. Além disso, as alterações mencionadas podem reciprocamente levar ao surgimento de mais crises convulsivas. Logo, a descrição dos processos que viabilizam a epilepsia são cruciais para o diagnóstico e para o desenvolvimento de tecnologias, fármacos e técnicas terapêuticas que visam atenuar, prever ou até evitar o surgimento de novas crises e a progressão da doença.

1.3. Lobo temporal

O lobo temporal, situado bilateralmente no cérebro, é, em linhas gerais, associado a processamentos cognitivo e sensorial, como a compreensão da linguagem, a memória e o aprendizado (Squire et al., 2004). Sua porção medial abriga componentes essenciais do sistema límbico, frequentemente referido como o "cérebro emocional" (LeDoux, 1998). Nestes substratos operam estruturas como o hipocampo, crucial para a consolidação de novas memórias, e o complexo amigdalóide, o epicentro do processamento emocional, particularmente na modulação de respostas de medo e ansiedade (LeDoux, 1998). Esta íntima relação anatomofuncional posiciona o lobo temporal medial como um portal cortical primário, através do qual as emoções são integradas às memórias e a outros processos cognitivos complexos, como a tomada de decisão e a cognição social (Pessoa, 2008; Squire & Zola-Morgan, 1991).

A região hipocampal é composta por áreas de associação polimodais que integram informações sensoriais altamente processadas de todas as modalidades sensoriais em representações configuracionais complexas, como o contexto ambiental (Maren et al., 2013; McDonald & Mott, 2017). Estruturalmente, o hipocampo é formado por três regiões principais: o giro denteado, Corno de ammon (CA1 - CA2 - CA3) e o subículo, organizadas em um circuito trissináptico. Este circuito, em sua forma mais clássica, envolve a projeção de aferências do córtex entorrinal para o giro denteado, que, por sua vez, se conecta a CA3, seguindo para CA2 e depois a CA1, culminando no subículo, que compartilha conexões com diversas regiões corticais e subcorticais (Andersen et al., 2006).

Essa arquitetura permite que o hipocampo funcione como um integrador e comparador de informações neurais, estando fortemente envolvido na formação de memórias declarativas, episódicas e no mapeamento do contexto ambiental (O'Keefe, 1976; Squire et al., 2004). Além disso, suas propriedades oscilatórias intrínsecas e conectividade extensa com o sistema límbico tornam-no um núcleo central na regulação de estados comportamentais complexos. A amígdala é um complexo de núcleos estritamente relacionados com as emoções, comportamentos e a memória

emocional. Suas principais aferências são conexões glutamatérgicas provenientes do córtex e tálamo, relacionadas a entradas sensoriais, e do hipotálamo e tronco encefálico, estas relacionadas aos sistemas autonômicos. Essas diversas aferências fazem da amígdala um centro de processamentos sensoriais, que, através de numerosas vias intra e internucleares, direcionam sinais para diversas outras regiões do cérebro (Sah et al., 2003).

As conexões entre a amígdala e hipocampo são essenciais para a formação de memórias espaciais, episódicas, declarativas e emocionais, além de processos motivacionais. Além disso, a amígdala promove a memória hipocampal, priorizando experiências emocionais ou estressantes, através de conexões majoritariamente recíprocas entre a região CA1, giro denteado, córtex entorrinal medial/lateral e parasubículo. Em especial, a região basolateral da amígdala possui projeções glutamatérgicas aferentes e eferentes para o hipocampo e córtex pré-frontal e tem um papel fundamental na valência dos estímulos processados, por consequências nos mecanismos de memórias e na modulação de comportamentos complexos (Song, 2023).

Além das conexões estruturais, populações neurais do hipocampo e da amígdala produzem oscilações eletrográficas rítmicas por propriedades intrínsecas de seus circuitos e neurônios (Çalışkan & Stork, 2019; Karashima et al., 2010). Estas flutuações do potencial de campo frequentemente se sincronizam, principalmente em consequência das diversas conexões recíprocas que interconectam as estruturas. A promoção do sincronismo entre elas, sobretudo influenciado por vias glutamatérgicas, cria janelas recorrentes que facilitam as interações das sinapses, podendo viabilizar, inclusive, a plasticidade sináptica (Ahmadi et al., 2025; Basu et al., 2016; McDonald & Mott, 2017; Seidenbecher et al., 2003).

No contexto das crises epilépticas, a atividade aberrante em uma das estruturas promove o rápido recrutamento da outra (Carriero et al., 2012). Especificamente para ELTM, danos estruturais ocasionados na amígdala e hipocampo ocorrem em decorrência da epileptogênese (McDonald & Mott, 2017). Logo, é de se esperar que alterações fisiológicas na primeira possam excitar, inibir, sincronizar e até dessincronizar circuitos no segundo, e vice-versa.

1.4. Modelos animais em estudos sobre epilepsia

Os modelos animais são comumente utilizados como forma de mimetizar sistemas humanos, a fim de reproduzir diferentes tipos de fenômenos, como os moleculares, estruturais, patológicos e sintomáticos. No estudo de ELTM ou de epilepsias generalizadas, diversos métodos podem ser utilizados na indução do processo epileptogênico e, conseqüente, na manifestação de crises espontâneas e recorrentes, como agentes químicos pró-convulsivantes, injúria craniana, modificações genéticas, entre outros (Kandratavicius et al., 2014; Rusina et al., 2021).

Nesse cenário, o Pentilenotetrazol (PTZ) é amplamente utilizado como agente químico para induzir crises epilépticas generalizadas em animais. Seu mecanismo de ação principal envolve um desequilíbrio entre os sistemas neurotransmissores GABAérgico e glutamatérgico. Em doses elevadas, o PTZ atua como um antagonista não competitivo dos receptores GABA e esse processo leva à excitotoxicidade, estresse oxidativo, ativação microglial e neuroinflamação, culminando em crises epilépticas e morte celular neuronal, principalmente no hipocampo e no córtex cerebral (Monteiro et al., 2024).

Apesar de ser também um modelo utilizado para epileptogênese (kindling químico), o PTZ possui uma vasta aplicabilidade em sua modalidade aguda, principalmente no teste de fármacos anticonvulsivantes. Com a administração de doses subcutâneas ou intraperitoneais, geralmente superiores a 60 mg/kg, é capaz de produzir crises mioclônicas e crises tonicoclônicas generalizadas em um período de tempo curto, além de ser capaz de gerar padrões eletrográficos de alta reprodutibilidade, semelhantes àqueles apresentados por humanos, principalmente na ELTM (Monteiro et al., 2024; Yang et al., 2019).

No que diz respeito a modelos de crise focal, o Ácido Caínico (KA, do inglês *Kainic Acid*) administrado via intrahipocampal é bem estabelecido. Este é um agente químico isolado e extraído de algas vermelhas *Digenea simplex*, análogo ao L-glutamato e agonista de receptores ionotrópicos de cainato, que nesta modalidade de administração atinge estruturas como amígdala, córtex

entorrinal e, sobretudo, o hipocampo (Lévesque & Avoli, 2013; Rusina et al., 2021).

É proposto que a liberação excessiva de glutamato, desencadeada pela ativação dos receptores ionotrópicos de cainato, leva à morte celular por excitotoxicidade e apoptose (Wu et al., 2025). A fase aguda do modelo é resultado da morte neuronal que leva o sistema ao *status epilepticus*, condição em que crises ocorrem de forma sucessiva por pelo menos 1 hora. Após o *status*, o circuito passa pelo processo epileptogênico, que ocasiona o surgimento de crises espontâneas e recorrentes em um período de 5 a 21 dias (Rusina et al., 2021).

A avaliação histológica *post mortem* dos animais indica lesão focal no hipocampo, predominantemente na região CA3 ipsilateral à injeção, brotamento de fibras musgosas, dispersão de células granulares no giro denteado e evidências de danos extra-hipocampais (Rusina et al., 2021; Lévesque & Avoli, 2013; Raedt et al., 2009). Ainda, observa-se a presença de padrões eletrofisiológicos semelhantes aqueles observados em pacientes com ELTM refratária (Raedt et al., 2009).

Portanto, o modelo de ácido caínico apresenta características dinâmicas, estruturais, eletrográficas e sintomáticas semelhantes àquelas descritas em relação à da epilepsia de lobo temporal mesial em humanos. Além disso, o estabelecimento de um foco primário representa um aspecto importante do modelo, pois, conhecendo-se o foco, pode-se descrever a dinâmica experimentada pelo sistema na deflagração e propagação de crises.

1.5. Eletroencefalografia

A relação entre energia elétrica e a atividade cerebral foi introduzida no fim do século XIX (Caton, 1875; Beck, 1890) e teve, entre as décadas de 1920 e 1930, significativo avanço com as pesquisas de Hans Berger, Edgar D. Adrian e Brian H. C. Matthews, que desenvolveram uma série de estudos que associaram, ao cérebro, flutuações do potencial elétrico causadas pela abertura e fechamento dos olhos de humanos (Compston, 2010). A aquisição dos sinais foi efetuada por eletrodos posicionados no escalpo e no córtex dos pacientes e Berger, o primeiro a descrever o fenômeno, atribuiu ao registro o

nome de eletroencefalograma (EEG) (Berger, 1929). Desde então, o EEG tem sido uma das ferramentas mais estudadas e aplicadas na compreensão do funcionamento do cérebro, bem como na caracterização e diagnóstico de patologias.

Mais tarde, em 1939, Alan L. Hodgkin e Andrew Huxley conduziram estudos que viriam a ser um marco para a modelagem da atividade neural e para o entendimento dos mecanismos de sinalização do sistema nervoso. Utilizando o modelo do axônio gigante da lula, eles descreveram a presença e as características elétricas dos potenciais de ação, registrando a flutuação do potencial elétrico intracelular (Hodgkin & Huxley, 1939). Em 1952, os mesmos pesquisadores publicaram um modelo matemático, utilizado quase sem alteração até os dias de hoje, que descreve o fenômeno da transferência de informação neural com base em alterações de permeabilidade de íons através da membrana celular e equações de cabos para propagação de campos elétricos dentro das projeções axonais. Este trabalho ainda é um marco importante das neurociências por descrever em detalhes como uma informação pode ser propagada por longas distâncias entre redes neuronais (Hodgkin & Huxley, 1952).

Contudo, o potencial de ação não explica por si só como uma informação pode ser retransmitida para outro neurônio. Em 1926, Adrian e Zottermann já haviam proposto que a intensidade de um estímulo seria codificada pela frequência dos disparos neurais de um determinado axônio (Adrian & Zotterman, 1926), porém, a definição de sinapse só veio depois com a contribuição de vários pesquisadores como Golgi, Ramon y Cajal, Sherrington, Otto Loewi (Kandel, 2013). Em conjunto, as ideias trouxeram uma flexibilidade enorme em como redes neurais poderiam processar a informação, uma vez que a codificação de frequência de potenciais de ação poderia modular o número de vesículas em exocitose contendo neurotransmissores.

A título de exemplo, no caso excitatório, o neurotransmissor é capaz de abrir canais de sódio no neurônio pós-sináptico provocando um influxo deste íon e promovendo a despolarização da membrana (Buzsáki et al., 2012). Por sua vez, o desbalanço momentâneo de cargas no meio extracelular produz o surgimento de um dipolo elétrico, cuja região pós-sináptica (sorvedouro)

apresenta polaridade negativa e a região pré-sináptica (fonte), polaridade positiva (Jellinger, 2011). Por outro lado, sinapses inibitórias, agindo em canais de cloreto ou de potássio, geram fontes de menor magnitude, uma vez que a força eletromotriz destes íons está bem próxima do potencial de repouso da célula.

Nesse sentido, as alterações no campo elétrico extracelular registrado no EEG são fruto, principalmente, de atividade sináptica excitatória. Sendo assim, a grandeza elétrica capturada por um eletrodo é a propagação do campo elétrico em volume condutor gerada pela atividade de diversos dipolos, que influenciam o potencial de campo local (LFP, do inglês *Local Field Potential*) (Buzsáki et al., 2012; Einevoll et al., 2013; Grech et al., 2008; Jellinger, 2011).

Embora o LFP ofereça uma janela única para estudo dos processos sinápticos integrativos das redes neurais, sua relação direta às múltiplas fontes de dipolos gerados no encéfalo, sobretudo na camada cortical, conferem aos registros um alto grau de complexidade, tornando-o um sinal ambíguo e de difícil interpretação (Einevoll et al., 2013). O problema direto do LFP é um exercício de predição com solução bem definida. Dada a localização de múltiplos dipolos, a posição do eletrodo de registro e a característica dinâmica dos momentos de dipolo (direção e amplitude elétrica em função do tempo), pode-se calcular a resultante do sinal a ser registrado. Em essência, conhecendo as causas (a atividade cerebral), podemos prever com exatidão o efeito (o traçado do EEG). Entretanto, a recíproca não é verdadeira e define o problema inverso do LFP: não é possível determinar a localidade e a contribuição dos dipolos que constituem um sinal registrado, uma vez que o sistema de equações matemáticas que descreve o problema não possui solução única para múltiplas fontes (Buzsáki et al., 2012; Grech et al., 2008).

Portanto, fica evidente a importância do LFP como ferramenta de estudo das funções integrativas de circuitos neurais na escala mesoscópica (a nível de circuitaria), entretanto a interpretabilidade das fontes de dipolos e, portanto, dos circuitos registrados, ainda é uma barreira a ser vencida (Varela et al., 2001). Nesse contexto, Einevoll et al. (2013) conclui que o LFP é um sinal extremamente rico, mas que seu potencial só será plenamente realizado

com o avanço de ferramentas computacionais e metodológicas adequadas. Ele sugere que o desenvolvimento e validação técnicas de análise e a construção de melhores modelos computacionais de rede em larga escala são fundamentais a esse processo.

Tão antiga quanto a eletroencefalografia, está a tentativa de se isolar a resposta gerada por um circuito específico quando provocado por estímulo externo: os potenciais evocados transitórios. Apesar de várias contribuições prévias (Canton, Beck, Larionov, Grasser, Davis e outros), foram os trabalhos de Dawson (1947) que começaram a dar a ideia de que cada circuito tinha uma assinatura eletrográfica específica, que era sobreposta à atividade espontânea de diversas outras redes neuronais. Contudo, somente adiante, com a aplicação da simples média de diversos sinais, tornou-se possível isolar a atividade de um único circuito evocado por uma sequência de estímulos, técnica utilizada em audiometria, decodificação de fala, estudos diagnósticos, entre outros (Moraes et al., 2000; Moraes & Garcia-Cairasco, 2001; Moreira et al., 2025).

Mesmo não sendo capazes de prever exatamente a localidade de um determinado gerador de atividade, registros de LFP muito provavelmente podem produzir informações relevantes associadas a um circuito neural específico, que, por sua vez, pode carregar informações importantes sobre o estado do sistema, seja ele acometido por um processo patológico ou não. Portanto, a utilização da eletrofisiologia para identificar circuitos e o momento em que estes se tornam relevantes em um processo neuronal são, ambas, técnicas com potenciais aplicações diagnósticas, preditivas e terapêuticas para diversas doenças neurológicas, como a epilepsia.

1.6. Escalas espaciais e temporais de registros eletrofisiológicos

Há décadas podemos descrever fenômenos eletrofisiológicos em diferentes escalas espaciais-temporais, como: (1) a atividade de canais iônicos isolados (Neher & Sakmann, 1976); (2) a alteração de potenciais intracelulares e extracelulares de neurônios (Hodgkin & Huxley, 1939); (3) a descrição de substratos neurais, por meio de registros com eletrodos profundos (Kandel & Buzsáki, 1997; Moraes & Garcia-Cairasco, 2001); e (4) a

comunicação/integração de larga escala entre áreas encefálicas, pela utilização do EEG de escalpo (Adrian & Zotterman, 1926; Berger, 1929).

A elucidação das complexas relações de causalidade entre os múltiplos níveis de organização do sistema nervoso representa uma fronteira científica. Tal desafio se mostra presente nas escalas mesoscópicas, onde a vasta rede de interações neurais obscurece mecanismos fundamentais (Freeman, 2000). Consequentemente, emerge a necessidade de desenvolver abordagens metodológicas inovadoras que sejam suficientemente precisas, tanto no espaço, quanto no tempo. O avanço nesta área depende da criação de técnicas com resolução espacial aprimorada e capacidade de medir de forma fidedigna a sincronia em circuitos definidos, populações neurais e nas vias de integração de longo alcance (Einevoll et al., 2013).

Em todas as modalidades mencionadas anteriormente, a frequência de amostragem dos registros eletrofisiológicos pode alcançar as grandezas necessárias para analisar as flutuações mais sutis do sistema nervoso no domínio do tempo, como o disparo de um neurônio (1 a 2 ms) ou uma condução monossináptica (4 a 6 ms) (Girard et al., 2001; Varela et al., 2001). Entretanto, a precisão espacial é prejudicada, seja pela dificuldade na definição da fonte do potencial elétrico enunciada pelo problema inverso do EEG, pela limitação do número de eletrodos, pelo tamanho do eletrodo ou pela propagação do campo elétrico no volume encefálico (Asadzadeh et al., 2020; Buzsáki et al., 2012; Parvizi & Kastner, 2018).

Com o advento da ressonância magnética funcional (fMRI) e de outras técnicas de imagem, foi possível caracterizar espacialmente a atividade neural de processos funcionais em tempo real, com resoluções de até 1 mm. Todavia, as técnicas são limitadas em descrever funções fisiológicas com a mesma resolução temporal que o EEG (Asadzadeh et al., 2020; Parvizi & Kastner, 2018).

Portanto, dentre os diferentes métodos de registro elétricos e magnéticos da atividade neural, presencia-se um desequilíbrio entre as escalas de tempo e espaço, tornando a precisão espaço-temporal um aspecto auto-exclusivo. Em outras palavras, quando um método é capaz de descrever o fenômeno eletromagnético com alta precisão temporal, a escala espacial é prejudicada e vice-versa.

No caso das epilepsias, tanto o EEG de escalpo, quanto a magnetoencefalografia (MEG), são amplamente utilizadas para diagnóstico e identificação de focos epilépticos corticais, entretanto, a precisão decai proporcionalmente em relação ao tamanho e à profundidade da região acometida. Especificamente para ELTM, por se tratar de estruturas límbicas, a precisão de ambas as técnicas para a caracterização de um foco é limitada, sendo necessária a utilização da eletroencefalografia intracraniana (iEEG), principalmente nos casos refratários, cuja remoção do foco deve ser efetuada cirurgicamente (Asadzadeh et al., 2020; Parvizi & Kastner, 2018).

Muito tem se desenvolvido em termos de estimativa de localização de focos epilépticos utilizando EEG e MEG, entretanto, o iEEG ainda é o método mais preciso e, portanto, mais utilizado para o estudo e identificação dos focos epilépticos em pacientes farmacorresistentes (Parvizi & Kastner, 2018). Em modelos animais *in vivo*, a lógica é a mesma, sendo os registros profundos os mais utilizados para a caracterização da dinâmica das redes e suas conexões anatômicas e funcionais.

1.7. Vetorização de amostras de campo elétrico

Teoricamente, um dipolo elétrico circundando de forma perpendicular um eletrodo com um raio fixo muito maior que a distância entre as cargas, gera um registro de campo constante. Entretanto, como a magnitude do campo elétrico medida pelos eletrodos depende da distância da fonte, ao adicionar outro ponto de registro suficientemente distante do primeiro, ambos os potenciais captados passam a se diferenciar (Buzsáki et al., 2012). Logo, a posição da fonte pode ser associada à combinação do registro dos eletrodos e a característica espacial, antes não capturada, passa a integrar os dados. Obviamente, quanto maior o número de eletrodos, melhor a estimativa da localização, sendo quatro pontos, com pelo menos 1 não coplanar, o mínimo necessário à construção tridimensional.

Se por um lado, a ativação de circuitos pode influenciar a amplitude do campo captado por um eletrodo de iEEG, a diferenciação combinada entre diferentes pontos de registro pode fazer emergir uma trajetória sensível à alteração do sinal registrado por quaisquer dos eletrodos. Mais do que isso,

esse trajeto se relaciona estritamente com a localidade do gerador da fonte que altera o campo, conferindo uma direcionalidade às amostras eletrofisiológicas.

Pesquisas datadas do início do século XVIII utilizaram o conceito de dipolos para elaboração da técnica de Vectocardiografia, que é uma análise avançada da condução elétrica cardíaca usada até hoje para diagnóstico de patologias e pesquisa clínica (Einthoven et al., 1913; Grishman et al., 1953; Klajman et al., 1963; Wilson et al., 1933).

Entretanto, foi em 2000 que conceitos semelhantes de vetorização foram utilizados para identificar características eletrográficas inerentes à dinâmica da atividade encefálica. Essa técnica adicionou informações derivadas do espaço aos registros convencionais, originando um vetor de alta precisão temporal, com magnitude e direção relacionadas aos dipolos formados durante a atividade neural (Moraes et al., 2000, 2005; Moraes & Garcia-Cairasco, 2001).

A metodologia, aqui nomeada de Vector-EEG (VEEG), emprega a configuração espacial dos eletrodos na inferência da posição de fontes e sorvedouros, através da estimativa do campo elétrico medido entre os registros de diferentes canais. Esta técnica foi introduzida no contexto de sondagem de circuitos neurais, sendo utilizada no estudo da dinâmica dos dipolos formados durante a deflagração de potenciais auditivos, evocados em ratos Wistar (Moraes & Garcia-Cairasco, 2001).

Em 2005, foi aplicada no estudo da dinâmica de crises convulsivas, evocadas por potenciais auditivos em ratos GEPR-9s. O estudo mostrou que o padrão eletrográfico característico de espícula-onda lenta observado nas crises generalizadas não é gerado por uma única fonte, mas sim pela soma das atividades de pelo menos dois circuitos neurais distintos e reverberantes. Um circuito do tronco encefálico-mesencéfalo é suficiente para gerar a crise motora e o componente de espícula, enquanto um circuito do prosencéfalo-mesencéfalo é responsável pela geração do componente de onda lenta. Nesse caso, a vetorização se demonstrou eficaz para dissociar a atividade desses diferentes circuitos neurais (Moraes et al., 2005).

Diante da crescente evidência de que a epilepsia é uma doença de circuitos em interação, e não apenas de hipersincronia, torna-se essencial o

uso de ferramentas que possam desvendar componentes centrais de uma rede epiléptica e elucidar como as suas interações afetam a dinâmica ictal (Paz & Huguenard, 2015). Neste contexto, o VEEG emerge como uma tática de identificação de padrões neurais por meio do estudo de suas componentes temporais e espaciais, que pode ser aplicada como forma de identificar microcircuitos com padrões de conectividade recorrentes importantes aos processos ictogênicos.

1.8. Biomarcadores

Biomarcadores são processos biológicos mensuráveis que medeiam, antecipam, participam ou sucedem um fenômeno natural ou patológico. Podem ser de natureza elétrica, química, morfológica, genética e funcional (Engel Jr, 2011). Biomarcadores substitutos, por outro lado, são definidos como uma medida laboratorial ou sinal físico que pode ser utilizado como substituto em um diagnóstico clínico na definição de como o paciente se sente, funciona ou sobrevive (Katz, 2004). Assim, um biomarcador pode ser um candidato a marcador substituto, no qual o primeiro expressa uma característica indicativa de certo fenômeno, enquanto o segundo efetivamente conclui um diagnóstico.

Especificamente para epilepsia, biomarcadores auxiliam principalmente na identificação de processos epileptogênicos e de epileptogenicidade, e podem ser aplicados no monitoramento de comorbidades, no estudo da efetividade de fármacos, assim como na caracterização de focos epiléticos. Também possuem potencial como sinalizadores preditivos, visto que algumas características do fenômeno podem ocorrer de forma antecipada, neste caso, os biomarcadores teriam papel fundamental na abolição ou sondagem de determinado processo patológico progressivo, evitando maiores prejuízos ao paciente (Engel Jr, 2011).

A própria crise é um marcador, entretanto, sua ocorrência isolada não fornece muitas informações acerca de sua evolução, causa ou tratamento. A eletroencefalografia tem se mostrado como uma ferramenta mais relevante para a definição de marcadores, tanto para processos de epileptogenicidade, quanto para à epileptogênese. Isso se dá pela ocorrência de padrões

visualmente estereotipados, que emergem tanto no período ictal, quanto no interictal. De fato, esses padrões podem estar relacionados ao circuito recrutado, bem como à gênese do processo de instabilidade que antecede sua propagação e o recrutamento de uma porção mais ampla do encéfalo. Desta forma, o EEG pode fornecer informações importantes quanto à localização de focos, gravidade da lesão, severidade de crises e a dinâmica espacial e temporal do processo epileptogênico (Engel Jr, 2011; Staba & Bragin, 2011).

Dos biomarcadores de EEG, destacam-se atualmente as oscilações de alta frequência, principalmente aquelas que ocorrem no período interictal, que são, como o nome sugere, flutuações do potencial de campo que se caracterizam por rápidas flutuações em frequências maiores que 100 Hz. O exemplo mais relevante de oscilações de alta frequência são os *fast ripples*, que ocorrem em uma banda de 250 Hz a 600 Hz, e são expressões dos potenciais de campo gerados por pequenos grupamentos neuronais, conectados de forma anormal após reorganização sináptica (Ogren et al., 2009; Staba & Bragin, 2011). Os *fast ripples* são altamente associados com áreas capazes de gerar crises espontâneas e estão presentes apenas naqueles pacientes que desenvolvem crises recorrentes, mas não naqueles que somente passaram por uma crise convulsiva (Staba & Bragin, 2011).

Ainda, evidências demonstraram que a reconstrução tridimensional do hipocampo de pacientes com ELTM, por ressonância magnética, pode indicar epileptogênese. Correlacionou-se a atrofia hipocampal ipsilateral ao foco epiléptico com a frequência de ocorrência de *fast ripples*, e conseqüentemente definiu-se as possíveis regiões capazes de gerar crises (Ogren et al., 2009).

No âmbito farmacológico, biomarcadores possuem o poder de impactar benéficamente a saúde do paciente e o custo do tratamento, se aplicados para previsão, validação ou até mesmo invalidação de determinado fármaco, visto que períodos de teste farmacológico podem demorar de semanas até anos. Além disso, os biomarcadores podem exercer influência na detecção de pacientes farmacorresistentes, fazendo o processo de testes dispensável (Engel Jr, 2011).

1.9. Estimulação elétrica e potencial evocado por estímulo

A excitabilidade do tecido nervoso estudada por Luigi Galvani inaugurou a eletrofisiologia, mostrando como impulsos elétricos podem produzir respostas motoras através dos nervos (Galvani, 1791). Sua noção de "irritabilidade", segundo a qual os tecidos vivos reagem a estímulos, revelou-se uma concepção fundamental para o entendimento moderno dos processos bioelétricos. A tal "irritabilidade" foi caracterizada, de fato, como sendo uma propriedade intrínseca de células neurais que, através de canais iônicos e das flutuações do potencial elétrico/químico dos meios celulares, são capazes de transmitir informações e codificar o ambiente (Catacuzzeno et al., 2024; Piccolino, 1997).

O mecanismo básico decorrente da estimulação elétrica (EE) de tecidos neurais é a despolarização das membranas celulares e consequente indução de potenciais de ação, entretanto, a aplicabilidade da técnica vai além deste único fenômeno. Estímulos em intensidades sub-limiáres podem, por exemplo, tornar as células mais propensas a disparos espontâneos ou endógenos, e, portanto, possuem a capacidade de modular a atividade neural. A depender dos parâmetros utilizados (frequência, duração, localização), a EE pode, além de excitar, inibir ou até silenciar sinapses, interferindo na liberação de neurotransmissores e nos ritmos oscilatórios de circuitos neurais. Ela pode, ainda, induzir plasticidade sináptica e reorganização de redes, favorecendo a estabilização ou a interrupção de padrões patológicos. Por fim, também influencia a migração de células precursoras neurais e a regeneração tecidual, evidenciando seu potencial não apenas como ferramenta experimental, mas também como estratégia terapêutica (Balbinot et al., 2025).

Especificamente para a epilepsia, no que se refere a aplicações terapêuticas, a estimulação cerebral profunda (DBS, do inglês *Deep Brain Stimulation*) e a estimulação neural responsiva (RNS, do inglês *Responsive Neural Stimulation*), acumulam uma crescente quantidade de estudos experimentais (Cota et al., 2021; Ehrens et al., 2025; Mesquita et al., 2011; Stieve et al., 2023) e aplicações clínicas alternativas à ablação (Fisher et al., 2010; Heck et al., 2014) para a atenuação ou interrupção de crises

epilépticas. Atuando respectivamente como malha aberta e malha fechada, DBS e RNS demonstram redução na quantidade de crises em pacientes, principalmente em tratamentos duradouros, sendo a dessincronização dos circuitos estimulados um possível mecanismo de ação (Foutz & Wong, 2022; Frauscher et al., 2023).

Para além da utilização do DBS como modulador, está o emprego da técnica para a sondagem clínica dos circuitos neurais quando conjugada a registros de EEG. A excitabilidade e o sincronismo de uma determinada rede podem ser avaliados através do potencial evocado relacionado ao evento (ERP, do inglês *Event-Related Potential*), sendo esse um importante biomarcador do estado do sistema (Frauscher et al., 2023; Matsumoto et al., 2017).

Conforme abordado na Seção 1.5, isso ocorre porque a aplicação de um estímulo gera um campo elétrico cuja propagação pode ser registrada em uma região cerebral alvo. Desse modo, o registro de um iEEG evocado (ou ERP) fornece informações cruciais sobre as vias neurais recrutadas, que, em condições normais, tendem a exibir um padrão de ativação consistente relacionado a um estímulo específico (Medeiros et al., 2018; Matsumoto et al., 2017). Este fundamento é bem estabelecido e aplicado em técnicas como o BERA, utilizado para o diagnóstico de patologias auditivas (Maggu et al., 2024; Moraes et al., 2000; Moraes & Garcia-Cairasco, 2001).

No contexto das epilepsias, a instabilidade intrínseca das redes neurais epiléticas, marcada por flutuações na excitabilidade e sincronia, altera dinamicamente a resposta do sistema a estímulos. Essa modulação não se restringe ao evento ictal, mas é particularmente crítica no período que o antecede, sendo uma importante janela para atuação terapêutica preditiva (Jirsa et al., 2014). Isso confere ao ERP o potencial de transcender a mera sondagem do sistema, atuando como uma ferramenta de previsão e podendo ser um biomarcador eletrofisiológico da iminência de um processo ictogênico (Medeiros et al., 2018; Medeiros et al., 2014).

Além disso, a recorrência de crises epiléticas induz uma neuroplasticidade mal adaptativa que reconfigura circuitos neurais, facilitando a propagação da atividade ictal e agravando o quadro clínico. Esse processo opera por mecanismos análogos à Potencialização de Longo Prazo (ou LTP,

do inglês *Long-Term Potentiation*) (Bliss & Lømo, 1973), fundamentados no postulado de Hebb, onde a ativação temporalmente correlacionada de neurônios fortalece suas conexões sinápticas (“neurônio que disparam junto, conectam-se”) (Hebb, 2002; Shatz, 1992). Como essa plasticidade patológica altera a responsividade do sistema, a avaliação longitudinal dos ERPs também emerge como uma ferramenta valiosa para monitorar essas alterações e, portanto, a progressão da doença (Medeiros et al., 2018).

Evidências sugerem que pulsos periódicos e não periódicos de 4 estímulos por segundo, aplicados ao complexo amigdalóide de animais tratados com PTZ, podem produzir efeitos pró-convulsivantes e anticonvulsivantes, respectivamente. No primeiro caso, estimulações elétricas em tempos regulares (a cada 0.25 segundos) aumentaram a suscetibilidade a crises e intensificaram a atividade neural em estruturas do sistema límbico. Entretanto, a simples reorganização das distribuições de intervalo-interpulso, foi capaz de induzir um efeito oposto (Cota et al., 2009; Mesquita et al., 2011).

Uma possível explicação é que os estímulos não periódicos interferem no acoplamento excessivo entre os osciladores e desestabilizam o fluxo anormal de recrutamento de circuitos repetitivos, ao ativarem canais de comunicação distintos engatilhados pelas diferentes fases das oscilações. Ambos os fatores são propostos como mecanismos de dessincronização e dessensibilização, retardando o surgimento das crises e seu posterior espalhamento/generalização (Cota et al., 2023).

Em contrapartida, a estimulação elétrica da amígdala a 0,5 Hz demonstrou modular a dinâmica da rede pré-ictal, apesar de não influenciar a latência ou a duração das crises no modelo de PTZ. Ao ser aplicada, observou-se uma sincronização de fase progressiva das descargas pré-ictais, resultando em potenciais evocados detectáveis no córtex cerebral antes do surgimento de crises epiléticas. Tais estímulos atuaram como um oscilador externo, impondo uma sincronia anormal entre os circuitos e intensificando a ativação de estruturas como tálamo, hipotálamo e a própria amígdala. Dessa forma, foi evidenciado um acoplamento patológico entre microcircuitos ictogênicos, cuja identificação se deu sem exacerbar a crise, viabilizando uma detecção precoce do evento ictal por meio da sondagem da rede (Medeiros et al., 2014).

Estratégias de estimulação elétrica, especialmente aquelas que modulam o acoplamento neural — como a aplicação de pulsos não periódicos ou de baixa frequência — oferecem não apenas a possibilidade de interferência terapêutica nos circuitos ictogênicos, mas também uma via promissora para a detecção antecipada de eventos epiléticos. Assim, a sondagem ativa e a manipulação dirigida da via amígdala-hipocampal emergem como abordagens relevantes tanto para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da ELTM, quanto para o desenvolvimento de intervenções clínicas mais precisas e responsivas.

Além da estimulação elétrica, outras modalidades têm sido exploradas no estudo das epilepsias, destacando-se a optogenética. Esta técnica permite o controle preciso da atividade neuronal por meio da manipulação genética de canais iônicos sensíveis à luz (opsinas), cuja expressão é induzida seletivamente em populações específicas de neurônios. Essa especificidade espacial e temporal permite a ativação ou inibição de circuitos neurais com alta precisão (Boyden et al., 2005; Deisseroth, 2011).

Apesar dos desafios éticos e técnicos que ainda limitam sua aplicação direta em humanos, a optogenética tem contribuído significativamente para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos das crises epiléticas e para a investigação de abordagens terapêuticas em modelos experimentais, principalmente na aplicação da estimulação para supressão de crises (Krook-Magnuson et al., 2013; Soper et al., 2016).

1.10. Justificativa e organização do capítulo

As altas taxas de incidência de epilepsia, combinadas com o grande número de casos cujo tratamento é ineficiente (20% a 30%), fazem deste distúrbio um dos grandes desafios da medicina moderna. A compreensão dos mecanismos que levam a tal condição é parte fundamental para o desenvolvimento de novos métodos de tratamento (World Health Organization, 2019).

Portanto, estudar como a atividade de um foco epilético primário se propaga para estruturas secundárias, compreendendo exatamente o que facilita um caminho em detrimento de outros, abre uma grande janela

diagnóstica e terapêutica para as epilepsias. Em outras palavras, se for possível identificar circuitos que passam a exercer controle sobre os demais (atratores de atividade) e conter o foco de atividade em uma área restrita, talvez possa-se elucidar como o próprio sistema plasticamente promove mecanismos de retroalimentação para mitigar a hiperexcitabilidade e desarticular o sincronismo entre áreas.

Neste cenário, a previsão e o entendimento da dinâmica de crises estão altamente relacionados à capacidade de supressão das mesmas. Pois, ao compreender as vias de propagação, principalmente a partir de um foco primário, pode-se erradicar a atividade anormal, interrompendo-a, por exemplo, com estímulos elétricos, de forma a reduzir sua capacidade de sincronização com regiões adjacentes (Cota et al., 2021). As ferramentas e análises propostas a seguir encaixam-se nesse escopo e auxiliam o desenvolvimento de outras metodologias abordadas pelos autores e colaboradores deste trabalho, como é o caso da estimulação não-periódica como potencial método terapêutico para contenção de crises

Portanto, é apresentado neste projeto a técnica de vetorização de amostras de campo elétrico descrita inicialmente por Moraes *et al.* (2000; 2001; 2005), denominada aqui como Vector-EEG. A abordagem foi aplicada em dois protocolos experimentais utilizando os modelos de PTZ sistêmico e KA intrahipocampal. Assim como mencionado na Introdução, a hipótese geral é que, ao adicionar a característica espacial aos registros, seja possível mapear circuitos e revelar padrões ocultos ao EEG na dinâmica da rede. Entretanto, para cada experimento também foram traçadas hipóteses complementares.

Os experimentos serão descritos separadamente a seguir, sob a nomenclatura de Protocolo 1 e Protocolo 2. No primeiro, com base nas observações feitas por Medeiros *et al.* (2014), foram aplicados estímulos de 0,5 Hz na amígdala durante a indução do processo ictogênico por PTZ em animais sob anestesia de uretano. Os ERPs foram registrados por conjuntos de VEEG posicionados bilateralmente nos hipocampos. Além de analisados como potenciais preditores de crise, os potenciais foram observados nos períodos pré e pós-ictal como biomarcadores do acoplamento da via

amígdala-hipocampal ao estímulo exógeno e utilizados como sondagem para a compreensão da dinâmica dos circuitos durante o processo ictogênico.

A hipótese testada foi de que os estímulos elétricos aplicados como facilitadores de uma via, aliados ao VEEG como ferramenta para evidenciar circuitos, pode revelar durante o processo ictogênico a existência de uma competição dos circuitos, que dinamicamente passa a convergir a um único atrator (ou ganhador). A seguir, hipotetizou-se que a utilização do VEEG é capaz de separar o circuito ganhador e produzir biomarcadores da iminência de crises a partir de eventos que progressivamente se sincronizam com a estimulação, assim como mostrado por Medeiros *et al.* (2014).

No segundo protocolo, aplicou-se a técnica de VEEG para o estudo comparativo em relação aos dados de iEEG. Foi utilizado um modelo de crise focal induzido por KA intrahipocampal em animais com livre movimentação. Neste experimento, registaram-se amostras de VEEG tanto na amígdala, quanto no hipocampo, identificando circuitos relevantes ao processo de progressão e atuação das regiões durante o status epilépticos.

A hipótese testada foi de que, em um experimento com animal em livre movimentação, o VEEG é capaz de revelar uma maior quantidade de circuitos do que aquelas produzidas pelos mesmos métodos de análise aplicados ao iEEG. Confirmada a primeira hipótese, esperava-se que as trajetórias de VEEG pudessem revelar a atuação de cada substrato registrado durante a progressão do *status epilepticus* e, portanto, hipotetizou-se que cada região tem uma contribuição para a deflagração, manutenção e extinção em cada uma das crises registradas.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

O presente capítulo objetivou empregar a amostragem vetorial de campo elétrico (Vector-EEG) como ferramenta para aprofundar a compreensão da dinâmica de recrutamento de circuitos neurais durante processos ictogênicos. A partir da caracterização de padrões de ativação em modelos experimentais de epilepsia generalizada e focal, buscou-se validar a capacidade da técnica em revelar e mapear as interações da rede epiléptica com maior precisão que abordagens convencionais, contribuindo para a identificação de biomarcadores eletrofisiológicos e para o entendimento dos mecanismos de seleção e competição que governam a evolução ictal.

2.2. Específico

2.2.1. Protocolo 1

Investigar a dinâmica do acoplamento da via amígdala-hipocampal durante o processo ictogênico induzido por pentilenotetrazol (PTZ). Utilizando a estimulação elétrica da amígdala como sonda e o Vector-EEG para o registro dos potenciais evocados (ERPs) no hipocampo, a análise visou caracterizar a evolução do processo a partir de duas hipóteses: (1) o processo ictogênico revela um estado de competição entre múltiplos circuitos, e esta competição dinamicamente converge para o predomínio de um único circuito atrator, que se torna patologicamente facilitado; e (2) o ERP se estabelece como um biomarcador preditivo da crise.

Para tal, foi necessário:

- Validar o potencial evocado (ERP): Primeiramente, analisar os registros do período basal para confirmar que o sinal evocado pela estimulação era de origem neural, comparando sua latência e variabilidade com as do ruído da estimulação.
- Analisar a progressão do acoplamento neural: Estudar a evolução do ERP ao longo da infusão de PTZ, calculando e comparando três

parâmetros em janelas móveis: a magnitude vetorial e a dispersão angular (derivadas do VEEG) e a potência instantânea (derivada do iEEG).

- Avaliar o potencial preditivo do ERP: Determinar o momento em que cada um dos três parâmetros atinge um limiar de atividade, a fim de quantificar sua capacidade de antecipar a crise eletrográfica.
- Identificar e classificar trajetórias anormais: Desenvolver e aplicar uma metodologia para identificar, a partir da magnitude vetorial, eventos de trajetória anormais nos períodos pré e pós-ictal e agrupá-los em clusters.
- Estudar a dinâmica dos clusters pré e pós-ictal: Comparar os períodos pré e pós-ictal em relação ao número de eventos, variedade de clusters, duração dos eventos e seu sincronismo com o estímulo.
- Quantificar a organização da rede: Calcular a matriz de transferência e a entropia de Shannon para as sequências de clusters, a fim de medir objetivamente a redução da complexidade e o aumento da recorrência de um circuito dominante após a crise.

2.2.2. Protocolo 2

Caracterizar a diversidade e a dinâmica de ativação de circuitos neurais em um modelo de epilepsia focal induzido por KA, comparando a capacidade de discriminação de padrões do Vector-EEG com a da análise convencional de iEEG em animais com livre movimentação. A hipótese central foi que a adição da informação espacial pelo Vector-EEG permitiria (1) identificar um repertório maior e mais preciso de circuitos envolvidos nas crises sucessivas do status epilepticus e (2) mapear a existência de circuitos especializados em cada região e como essa interação está relacionada com a dinâmica das sucessivas crises.

Para tal, foi necessário:

- Desenvolver um algoritmo de detecção automática: Criar e aplicar uma rotina para detectar e isolar eventos anormais de forma automática, utilizando a magnitude vetorial para os dados de VEEG e a potência instantânea para os dados de iEEG.

- Realizar o agrupamento e classificação de eventos: Agrupar todos os eventos detectados em clusters únicos, utilizando a mesma rotina aplicada aos dados do Protocolo 1.
- Analisar a progressão da complexidade da rede: Utilizar regressão linear para investigar se o número total de eventos e de clusters identificados aumentava ao longo das crises sucessivas do status epilepticus.
- Classificar os clusters em relação à preferência por janela da crise: Rotular os clusters com base em sua preferência de ativação para o início, meio ou fim de cada crise e validar estatisticamente essa especialização temporal.
- Classificar os clusters em relação à preferência por crise: Identificar e rotular clusters que ocorriam preferencialmente em crises específicas (ex: apenas na crise 3), para analisar como a rede epiléptica incorpora novos circuitos ao longo do tempo.
- Realizar a análise comparativa (VEEG vs. iEEG): Comparar diretamente o desempenho das duas técnicas, quantificando e testando estatisticamente as diferenças no número total de clusters, no número de clusters com preferência por janela da crise (CPJC) e no número de clusters com preferência por crises específicas (CPCs) identificados por cada método.

3. METODOLOGIA

3.1. Cálculo do VEEG: amostras vetoriais de campo elétrico

Embora a dinâmica do processo epileptogênico, principalmente em relação à propagação de crises entre diferentes regiões, seja ainda pouco conhecida (Bertram, 2013), um circuito ativado de forma aberrante é surpreendentemente recrutado de maneira consistente durante o processo ictogênico (Jirsa et al., 2014). Por consequência, a sucessão de fenômenos que fazem parte propagação de uma crise pode ser fundamental ao desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico, previsão, prevenção e tratamento das epilepsias.

De fato, a força de campo elétrico gerada por um dipolo e registrada por um eletrodo é inversamente proporcional ao quadrado da distância entre os dois elementos, sendo assim, um eletrodo mais próximo à fonte de atividade tende a registrar um potencial de campo de maior amplitude, se comparado a um eletrodo mais distante. Desta forma, ao subtrair o sinal de um pelo outro, pode-se atribuir ao resultado um vetor com intensidade e sentido dependentes da proximidade dos eletrodos em relação ao dipolo, cuja direção reside na reta formada pelos dois pontos de registro.

Convenientemente, ao se posicionar quatro eletrodos em conformidade com coordenadas cartesianas ortogonais tridimensionais $C(0, 0, 0)$, $X(1, 0, 0)$, $Y(0, 1, 0)$, e $Z(0, 0, 1)$, subtrair o potencial elétrico medido nos três últimos pontos ($V_X(t)$, $V_Y(t)$ e $V_Z(t)$, respectivamente) pelo potencial elétrico medido no primeiro ($V_C(t)$) e dividir cada componente pela distância que separam os pontos de medição ($d(C, X)$, $d(C, Y)$, $d(C, Z)$, respectivamente), tem-se a aproximação do gradiente do potencial elétrico - e, portanto, do campo elétrico - em cada eixo ortogonal.

Nesse caso, três vetores dependentes do tempo são formados, eles residem respectivamente nos eixos unitários \vec{u}_{CX} , \vec{u}_{CY} e \vec{u}_{CZ} e sua combinação origina um vetor tridimensional $E_{VEEG}^{\rightarrow}(t)$ cuja amplitude, sentido e direção

sofrem influência das regiões de maior atividade durante o registro de um processo neural.

O cálculo da distância Euclidiana entre dois pontos quaisquer A e B está mostrada na Equação 1, na qual $d(A, B)$ é a distância, $\|\cdot\|_2$ é a norma vetorial e \vec{A} e \vec{B} são os vetores que definem os pontos A e B . A Equação 2 se refere aos eixos ortogonais, enquanto a Equação 3 apresenta o campo elétrico $\vec{E}(t)$, dependente do tempo t , como o gradiente do potencial elétrico $\nabla V(t)$ registrado entre dois pontos arbitrários A e B , sendo $V_A(t)$ e $V_B(t)$ a potência medida nos dois pontos e \vec{u}_{AB} o vetor que os conecta. As Equações 4, 5 e 6 expandem a Equação 3 para o caso tridimensional explicado nos parágrafos anteriores, sendo $\vec{E}_x(t)$, $\vec{E}_y(t)$ e $\vec{E}_z(t)$ as estimativas do campo elétrico para cada um dos eixos. Por fim, a Equação 7 define o cálculo do Vector-EEG, $\vec{E}_{VEEG}(t)$, que em resumo representa uma estimativa do real campo elétrico tridimensional no ponto C , dado pelo gradiente do campo escalar de tensões no encéfalo.

$$d(P_1, P_2) = \left\| \vec{P}_2 - \vec{P}_1 \right\|_2 \quad (1)$$

$$\vec{u}_{CX} = [1, 0, 0], \quad \vec{u}_{CY} = [0, 1, 0], \quad \vec{u}_{CZ} = [0, 0, 1] \quad (2)$$

$$\vec{E}(t) = -\nabla V(t) \approx \frac{V_A(t) - V_B(t)}{d(A, B)} \cdot \vec{u}_{AB} \quad (3)$$

$$\vec{E}_x(t) \approx \frac{V_C(t) - V_X(t)}{d(C, X)} \cdot \vec{u}_{CX} \quad (4)$$

$$\vec{E}_y(t) \approx \frac{V_C(t) - V_Y(t)}{d(C, Y)} \cdot \vec{u}_{CY} \quad (5)$$

$$\vec{E}_z(t) \approx \frac{V_C(t) - V_Z(t)}{d(C, Z)} \cdot \vec{u}_{CZ} \quad (6)$$

$$\vec{E}_{VEEG}(t) = \vec{E}_x(t) + \vec{E}_y(t) + \vec{E}_z(t) = \left[\vec{E}_x(t), \vec{E}_y(t), \vec{E}_z(t) \right] \quad (7)$$

A representação de um conjunto de eletrodos de VEEG pode ser obtida pela Figura 1A. Cada grupo de quatro eletrodos, representados por esferas, formam um conjunto de VEEG, ligado por retas. Nesse conjunto, os eletrodos estão espaçados igualmente entre si e arranjados em conformidade com um espaço cartesiano, sendo um eletrodo para cada eixo (X, Y e Z) e um eletrodo central (C). Um conjunto de VEEG também será referido como tetraedro devido à sua geometria, uma vez que a conformação dos pontos de registros formam um tetraedro trirretângulo.

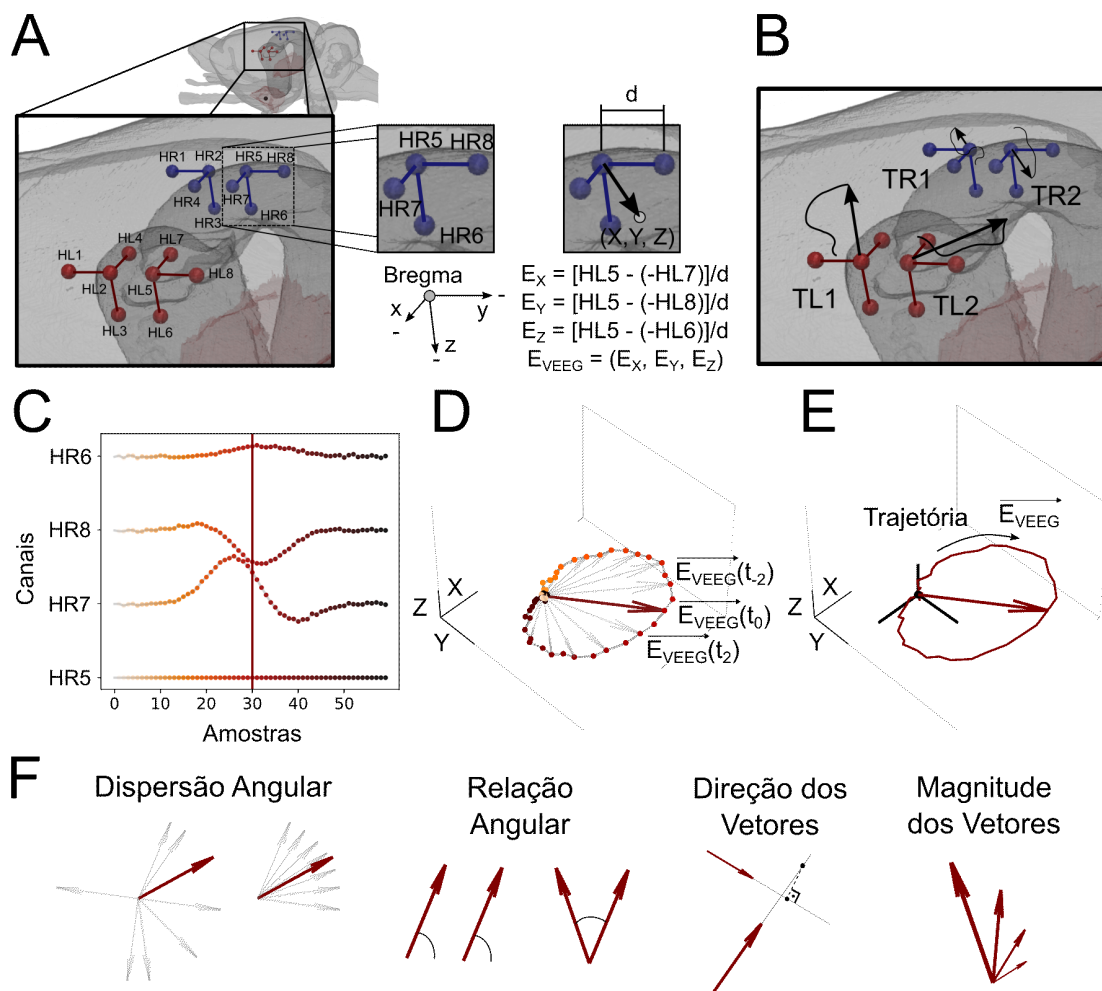


Figura 1 - Vetorização de amostras de campo elétrico.

(A) Desenho esquemático de conjuntos de VEEG registrados no Hipocampo. Esferas representam os eletrodos, enquanto as linhas conectam conjuntos de VEEG. À direita é mostrado um exemplo de cálculo de VEEG, a referência das coordenadas em relação ao Bregma e um vetor resultante. (B) Vetores e trajetórias medidas em diferentes conjuntos de VEEG. (C) Potenciais de campo hipotéticos

registrados por um conjunto de VEEG (conjunto TR2). (D) Vetores relacionados ao registro hipotético da Figura 1C. (E) Trajetória relacionada ao registro hipotético da Figura 1C. (F) Exemplo de cálculos aplicados aos vetores do VEEG.

Utilizando as coordenadas estereotáxicas de cada eletrodo e o bregma como referência espacial, é possível calcular, por meio das equações acima, o $E_{VEEG}^{\rightarrow}(t)$ conforme mostrado na Figura 1B. Para melhor exemplificar o processo, apresenta-se, na Figura 1C, um registro arbitrário observado por cada um dos canais de um conjunto de VEEG (no exemplo, dados simulados para o tetraedro TR2). Cada amostra de campo elétrico registrada em um instante de tempo é representada por um ponto no gráfico, enquanto as cores refletem a progressão temporal. Ao aplicar a vetorização enunciada acima, cada amostra 4-dimensional será convertida em um vetor tridimensional, exemplificado pelo vetor $E_{VEEG}^{\rightarrow}(t_0)$ destacado pela linha vertical vermelha na Figura 1C e pelos vetores correspondentes nas Figura 1D e 1E.

A junção dos vetores de cada instante de tempo forma uma matriz E_{VEEG} que é denominada trajetória, apresentada em função do tempo na Equação 8 e exemplificada pela Figura 1E, sendo \mathbb{R}^{3xn} o espaço real tridimensional para n amostras de tempo. As trajetórias, assim como os vetores que as constituem, foram utilizadas neste trabalho como forma de inferir circuitos participantes da dinâmica de processos neurais, uma vez que refletem indiretamente a formação de dipolos e também características relevantes em relação à localidade da fonte de atividade.

$$E_{VEEG} = \left[E_{VEEG}^{\rightarrow}(t_0)^T, E_{VEEG}^{\rightarrow}(t_1)^T, \dots, E_{VEEG}^{\rightarrow}(t_n)^T \right] \in \mathbb{R}^{3xn} \quad (8)$$

Dipolos formados próximos a um único eletrodo externo (X, Y ou Z) tendem a aumentar a trajetória em uma única direção, enquanto dipolos distantes ou equidistantes dos eletrodos externos tendem a zerar a mesma. A direção resultante dos vetores depende do posicionamento do dipolo (ou dipolos) que os influenciam, entretanto, a amplitude evidencia a intensidade de ativação. Além disso, é de se esperar que circuitos predominantes e

repetitivos provoquem nos conjuntos de VEEG trajetórias únicas e repetitivas, conforme mostrado por vídeos demonstrativos disponíveis em <https://drive.google.com/drive/folders/1hqzANuy1-wkAdjwQsd9Qpi4pkqrBOMWU?usp=sharing>.

A Figura 1E mimetiza um desses circuitos, começando de uma atividade basal de baixa amplitude, passando por um aumento da magnitude vetorial e, por fim, retornando ao estado basal. Como mostrado pela Figura 1F, os vetores podem adicionar informações relevantes ao estudo dos circuitos recrutados durante processos fisiológicos através de análises como dispersão angular, produto escalar, direção e amplitude.

3.2. Metodologia de construção de matrizes de eletrodos profundos

No contexto da proposta deste trabalho, as matrizes de eletrodos profundos desempenham um papel fundamental para a medição da atividade elétrica das regiões encefálicas de interesse, e, portanto, para o sucesso dos experimentos. Os registros foram efetuados por meio do sistema de aquisição de sinais da Open Ephys (Open Ephys® Acquisition Board - 3rd Generation, referida, a partir daqui, apenas como Open Ephys) conjugado ao *headstage* (dispositivo acoplado à cabeça do animal experimental para a coleta de registro eletrofisiológicos) (Mourão et al., 2022).

Além disso, como forma de compatibilizar os requisitos do *headstage* adaptado, foi desenvolvido um sistema de construção de matrizes composto por dois principais componentes: (1) uma placa perfurada que define as coordenadas estereotáxicas anteroposteriores (AP) e médio-laterais (ML), destacada na Figura 2A (Mourão et al., 2022), e (2) uma base de resina, impressa em impressora 3D, que fornece a referência dorsoventral (DV), representada na Figura 2B.

Para cada um dos protocolos, após a definição da região-alvo no cérebro, utilizou-se o KiCAD 8 e o Autodesk® Fusion 360 para projetar, respectivamente, a placa AP/ML e a base DV. Cada furo na placa AP/ML se alinha a uma cavidade de 1 mm de profundidade na base DV e, em conjunto, definem a coordenada estereotáxica de cada região alvo. Quatro furos periféricos adicionais acomodam agulhas G20 (Figura 2C painel I), que

forneem suporte mecânico ao fixar a placa perfurada AP/ML na base DV, formando uma estrutura estável para a construção da matriz de eletrodos, conforme mostrado no painel II da Figura 2C.

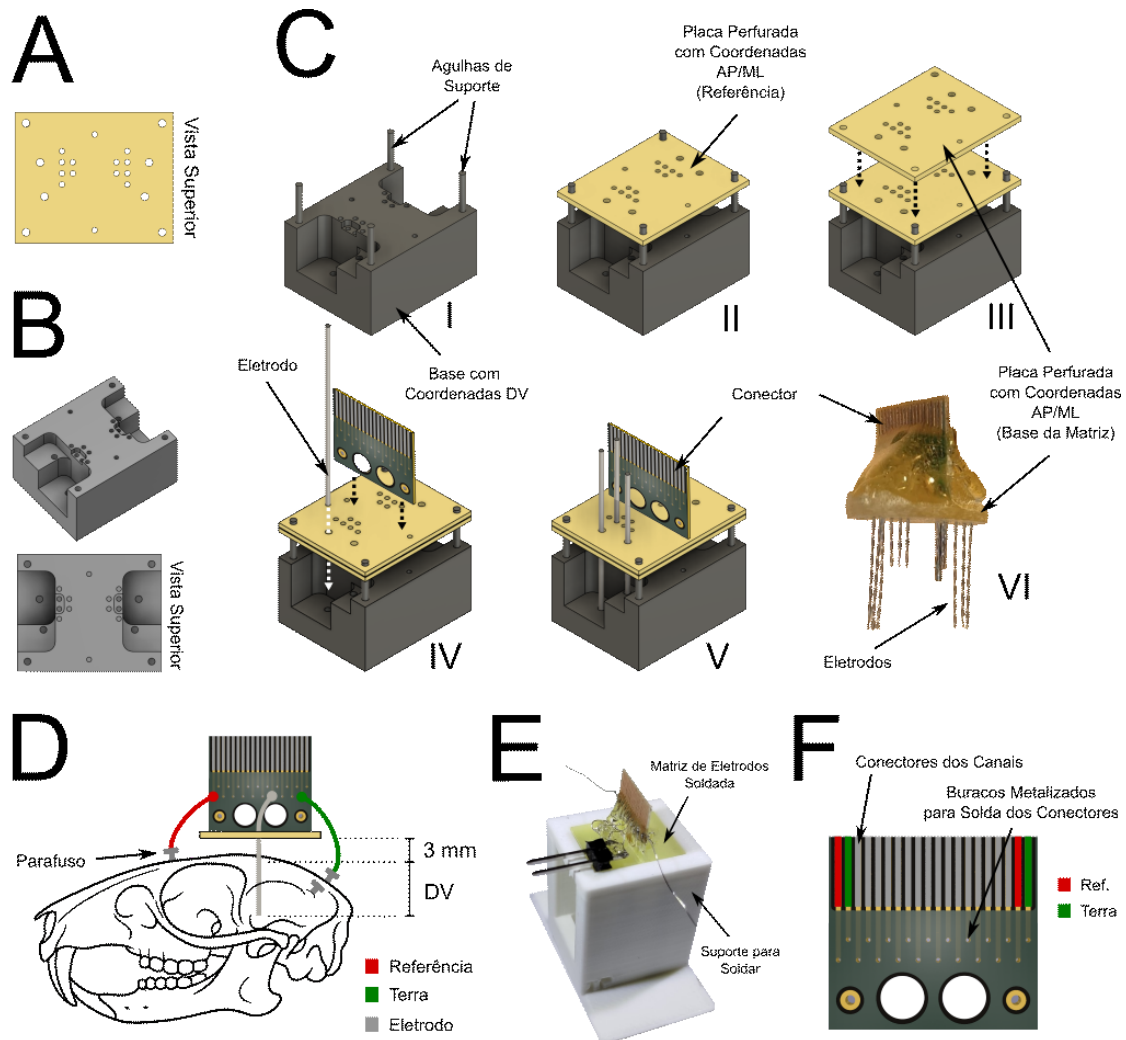


Figura 2 - Desenho esquemático da construção de matrizes para registros de iEEG em múltiplas áreas. (A) Placa perfurada para referência das coordenadas estereotáxicas anteroposteriores e médio lateral (AP/ML). (B) Base de construção para referência das coordenadas dorsoventrais (DV). (C) Passo a passo da confecção da matriz de eletrodos. (D) Esquema de posicionamento da matriz no crânio do animal experimental. (E) Base para manipulação da matriz durante o processo de solda dos eletrodos, exemplo de matriz do Protocolo 1. (F) Desenho esquemático da placa de circuito impresso compatível com conectores SMD/FPC.

Para cada matriz de eletrodos, uma placa perfurada adicional foi fixada ao suporte, acima da placa AP/ML de referência. A placa adicional serviu como base da matriz e nela foram posicionados os eletrodos (791400 ou

791600 AM Systems Inc.®, Carlsborg, WA, EUA), cânulas e conectores, como mostrado no painel III da Figura 2C.

A distância entre a placa perfurada e o orifício correspondente na base determina a posição DV desejada para cada eletrodo. Além da profundidade anatômica indicada pelas coordenadas estereotáxicas, foram considerados 3 mm adicionais: 1 mm para acomodar a espessura do crânio e 2 mm de espaçamento entre a matriz e a superfície craniana, importante para a fixação do implante. O desenho esquemático está representado pela Figura 2D.

Uma vez concluída a base de montagem, foram posicionados os eletrodos — e qualquer outro componente necessário — passando-os pelas duas camadas de placa perfurada e garantindo o alinhamento da extremidade distal ao orifício correspondente na base DV, conforme mostrado nos painéis IV e V da Figura 2C. Após o posicionamento, os eletrodos foram fixados à placa AP/ML com o uso de super cola (Tekbond® 793) e resina epóxi (Redelease Resina 2001 e Endurecedor 3154). Em seguida, fixou-se também a placa de circuito impresso (Figura 2E) compatível com os conectores SMD/FPC de 20 vias (16 canais, 2 referências e 2 terras) utilizados no headstage adaptado.

Após alguns minutos de espera para a solidificação da resina epóxi, cada matriz de eletrodos foi cuidadosamente destacada da base DV e transferida para um suporte de soldagem (Figura 2F, exemplo de matriz utilizada no Protocolo 1), projetado no *software* Fusion 360 e impresso com filamento PLA ou resina (3D Lab® PLA Speed Premium diversas cores ou Sunlu MLab Photopolymer Resin Standard 405nm, respectivamente).

Nesta etapa, cada eletrodo foi inserido no furo metalizado do conector e soldado (foi utilizado fluxo de solda para garantir o contato apropriado). Adiante, os fios de referência e aterramento (791400 ou 791600 AM Systems Inc.®, Carlsborg, WA, EUA) também foram soldados, conforme apresentado pelo esquema da Figura 2F e também exemplificado pela Figura 2E. Por fim, cada matriz foi finalizada com resina epóxi — deixando apenas o conector plano exposto — e o material excedente lixado, de forma a minimizar o tamanho total do componente. O painel VI da Figura 2C apresenta um exemplo de matriz de eletrodos utilizada no Protocolo 2.

É importante observar que cada protocolo experimental necessitou de uma combinação específica de base DV e placa perfurada AP/ML, adaptada às regiões cerebrais de interesse. As coordenadas estereotáxicas foram definidas previamente e elementos como cânula para administração ou eletrodo de estimulação foram também adicionadas à construção. Os componentes aqui descritos foram todos fabricados com impressoras 3D (Creality® Halot Sky 2022 para resina e Creality® Ender-5 Plus para filamento plástico, ambas de Shenzhen, China) e/ou máquinas de fresagem de placas de circuito impresso (PCBs, do inglês *Printed Circuit Boards*) no laboratório (LPKF® ProtoMat S64 Circuit Board Plotter, Garbsen, Alemanha).

3.3. Animais e grupos

O protocolo experimental 1 (CEUA 311/2024) e o protocolo experimental 2 (CEUA 266/2023), foram realizados em ratos adultos da linhagem Wistar ($n = 10$ e $n = 13$, respectivamente), entre 250 e 310 g, com idade de sete a oito semanas, obtidos no Biotério Central da UFMG e mantidos, durante experimentação, no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Nos dois protocolos, apenas um grupo foi considerado, sendo cada animal o próprio controle.

Em ambos, no período anterior à execução do protocolo, os animais foram habituados ao experimentador e permaneceram agrupados em caixas forradas com maravalha (~3 cm) com no máximo quatro animais em cada. Durante o período tiveram acesso irrestrito à água e comida, um ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$.

3.4. Cirurgia estereotáxica

Antes de cada procedimento, a sala de cirurgia foi devidamente higienizada com álcool 70% e os materiais esterilizados em uma autoclave, limpos com detergente enzimático e álcool 70% e mantidos sob incidência de luz ultravioleta quando não necessários.

No processo cirúrgico do Protocolo 1, os animais foram anestesiados pela administração de 1.5 g/kg de uretano intraperitoneal (Yagishita et al.,

2020), enquanto no Protocolo 2, os animais foram anestesiados com anestesia inalatória de isoflurano (1mL/mL, Isoforine®, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda) em oxigênio, sendo induzidos por 500-1000 mL/min a 5% e mantidos em sedação por 100-200 mL/min a 2-3% d. Após a sedação, em ambos os protocolos, os animais foram tricotomizados na região superior da cabeça e fixados a um aparelho estereotáxico (Stoelting® Co., Wood Dale, IL, USA) através de barras auriculares.

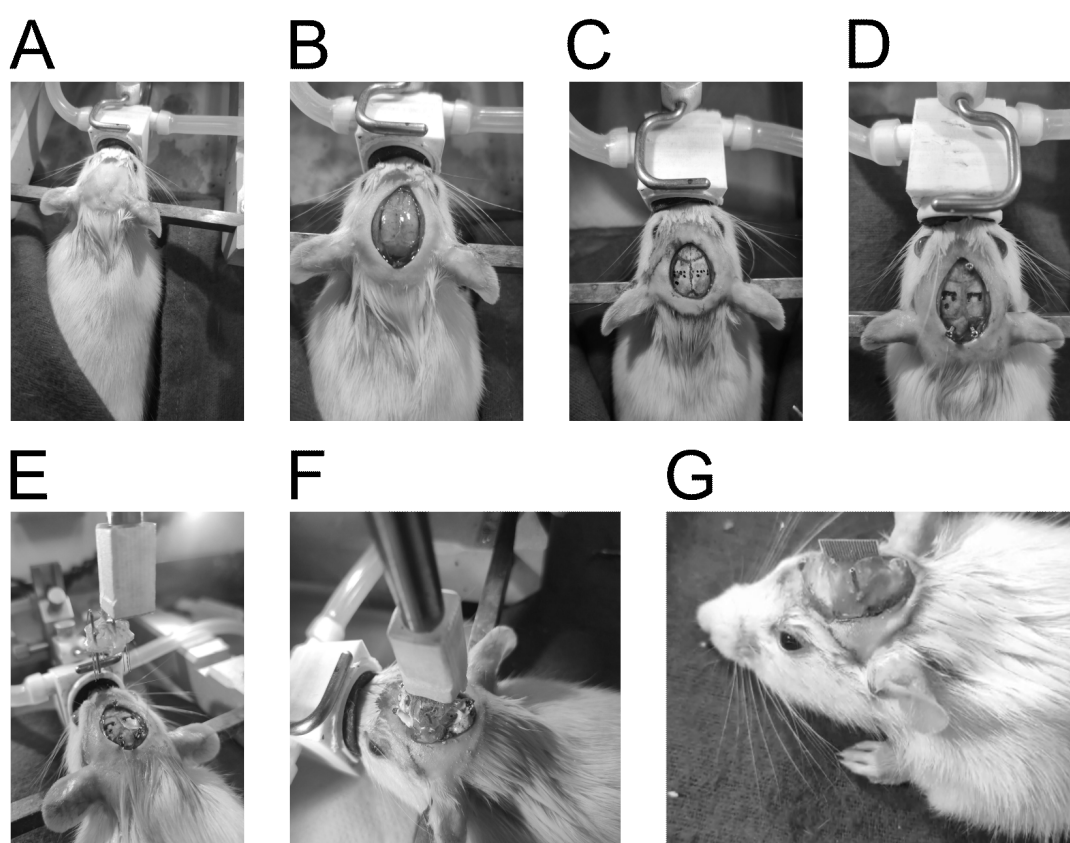


Figura 3 - Etapas do procedimento cirúrgico para implantação da matriz de eletrodos, exemplo representativo referente ao Protocolo 2.

(A) Posicionamento no estereotáxico. (B) Tricotomia do couro cabeludo. (C) Marcação das coordenadas de perfuração. (D) Perfuração da calota craniana e fixação dos parafusos. (E) Posicionamento da matriz (fixada à torre estereotáxica). (F) Implantação da matriz e fixação com cimento de zinco. (G) Acabamento com acrílico.

O campo cirúrgico foi limpo com salina estéril e polivinil pirrolidona iodo (PVPI) e aplicou-se aproximadamente 3 mL de anestesia local (lidocaína + epinefrina 2%) no tecido subcutâneo (Figura 3A). Em seguida, os animais tiveram uma porção da calota craniana exposta por meio de uma incisão

realizada com bisturi e os periosteos removidos por raspagem. O processo anterior permitiu a visualização das suturas cranianas (bregma e lambda) utilizadas como referências anatômicas para verificação do correto alinhamento da cabeça em relação ao estereotáxico (Figura 3B).

As coordenadas anteroposteriores e médio-laterais, relativas aos eletrodos e à cânula, foram medidas com base na posição do bregma e devidamente marcadas (Figura 3C). Perfurou-se, então, círculos de 0,5 mm de diâmetro na calota craniana dos animais, com auxílio de uma broca e, nas regiões correspondentes ao posicionamento dos eletrodos, expandiu-se as perfurações de maneira a criar uma pequena janela acima de cada hemisfério cerebral. Ainda, perfurou-se três círculos adicionais nos ossos occipital e frontal para colocação de parafusos, dois deles para aterramento e referência dos sinais eletrofisiológicos e outro para melhor fixação mecânica da MEP (Figura 3D).

A matriz foi então fixada na torre estereotáxica, alinhada em relação ao crânio do animal e inserida com referência na coordenada dorsoventral do eletrodo mais profundo (Figura 3E). O fio referente ao aterramento foi soldado ao parafuso preso ao osso frontal e os fios de referência a um dos parafusos no osso occipital. Após a inserção, a montagem foi fixada aos parafusos com cimento de zinco (Figura 3F) e, posteriormente, a região exposta foi coberta por acrílico dentário (Figura 3G). Descrições detalhadas de cada tipo de matriz de eletrodos que foi utilizada nos experimentos se encontram nas seções posteriores.

Durante as etapas do processo cirúrgico as respostas sensoriais dos animais foram testadas, a fim de acompanhar a sedação. Ao final do procedimento, os animais foram direcionados conforme o desenho experimental de cada protocolo.

Os sujeitos experimentais do Protocolo 1 tiveram a veia caudal lateral acessada por um cateter G22, que foi isolado e fixado à cauda. Por fim, ainda sob efeito da anestesia, foram conduzidos ao experimento.

Já os animais do Protocolo 2 receberam cuidados adicionais, devido à recuperação necessária ao experimento com livre movimentação. Eles receberam uma única dose de 5 mg/Kg de tramadol por via subcutânea e pentabiótico veterinário Baytril 5 mg/kg por via intramuscular (Geiger et al.,

2008; Messier et al., 1999). Em seguida, permaneceram sob recuperação durante 7 dias, período no qual foram feitas observações periódicas para acompanhamento do quadro pós-cirúrgico, sendo avaliados o peso e o comportamento.

3.5. Protocolo experimental 1 - PTZ

O desenho experimental, mostrado pelas Figuras 4A e 4B, foi conduzido em quatro etapas principais, sendo elas: (1) procedimento cirúrgico para inserção dos eletrodos de registro descrito acima, (2) registro de iEEG da atividade basal com e sem estimulação elétrica, (3) registro de iEEG durante a administração de PTZ intravenosa e a aplicação de estimulação elétrica e, por fim, (4) eutanásia do animal e estudo histológico para confirmação do posicionamento dos eletrodos.

A execução do protocolo envolveu o registro de 16 eletrodos distribuídos em quatro áreas alvo: dois conjuntos na região CA1 do hipocampo direito e dois conjuntos na região CA1 do hipocampo esquerdo. Além dos eletrodos para registro, também foi implantado um eletrodo de estimulação bipolar na amígdala basolateral esquerda. Os alvos foram escolhidos por possuírem relevância nos processos ictogênicos gerados pelo modelo escolhido e as coordenadas correspondentes estão apresentadas pela Tabela 1 e pela Figura 4C acima (Paxinos & Watson, 2013).

As matrizes de eletrodos necessárias à execução do experimento foram produzidas conforme a Seção 3.2. Em cada conjunto de VEEG, foram utilizados eletrodos de aço inoxidável revestido com PFA simples 791600 (50,8/114,3 μm de diâmetro do fio/PFA, AM Systems Inc.®, Carlsborg, WA, EUA) para registro das coordenadas X e Y e pares trançados com fios de aço inoxidável revestido com PFA 791400 (50,8/114,3 μm de diâmetro do fio/PFA, AM Systems Inc.®, Carlsborg, WA, EUA) para registro das coordenadas Z e Central (Figura 5A). Os pares trançados foram feitos com 8 voltas por centímetro e tiveram seus fios afastados em 1 mm, para criar a conformação tridimensional mostrada na Figura 5B.

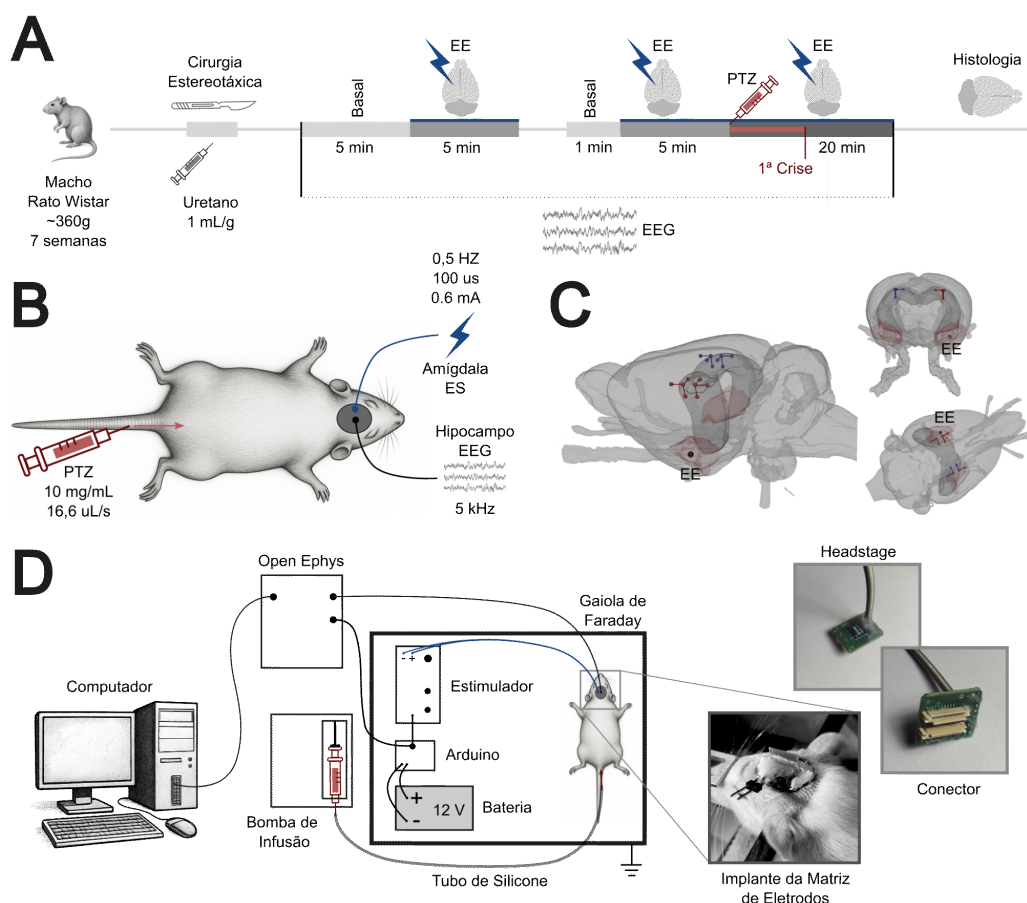


Figura 4 - Etapas do protocolo experimental 1.

(A) Descrição do Protocolo 1. (B) Esquemático das características da administração de PTZ, estimulação elétrica e registro do iEEG. (C) Posicionamento dos eletrodos de registro e de estimulação. (D) Configuração da sala durante o experimento. À direita estão representados exemplos do capacete do animal após a cirurgia e do headstage/conector utilizados para a aquisição do iEEG.

Além disso, utilizou-se a mesma configuração de pares trançados para a confecção dos eletrodos de estimulação, com o objetivo de recrutar uma região considerável da amígdala basolateral. Os eletrodos de estimulação também foram inseridos nas matrizes e soldados à pinos de conexão posicionados na lateral esquerda do implante, como exemplificado pela Figura 1E e 5C.

Tabela 1 - Coordenadas estereotáxicas para inserção dos eletrodos de registro e de estimulação, referentes ao protocolo experimental 1.

Área	VEEG	Médio-lateral	Anteroposterior	Dorsiventral
Hipocampo	Central	-3,00	-2,50	-2,80
	Eixo X	-2,00	-2,50	-2,80

Esquerdo (TL1)	Eixo Y	-3,00	-1,50	-2,80
	Eixo Z	-3,00	-2,50	-3,80
Hipocampo Esquerdo (TL2)	Central	-3,00	-3,50	-2,80
	Eixo X	-2,00	-3,50	-2,80
	Eixo Y	-3,00	-4,50	-2,80
	Eixo Z	-3,00	-3,50	-3,80
Hipocampo Direito (TR1)	Central	+3,00	-2,50	-2,80
	Eixo X	+2,00	-2,50	-2,80
	Eixo Y	+3,00	-1,50	-2,80
	Eixo Z	+3,00	-2,50	-3,80
Hipocampo Direito (TR2)	Central	+3,00	-3,50	-2,80
	Eixo X	+2,00	-3,50	-2,80
	Eixo Y	+3,00	-4,50	-2,80
	Eixo Z	+3,00	-3,50	-3,80
Estimulação		+5,00	-2,50	-8,60

Após o procedimento cirúrgico para o implante da matriz de eletrodos descrito anteriormente, cada animal foi conduzido para a sala de experimentação, equipada com computador, gaiola de Faraday, sistema de aquisição de sinais eletrofisiológico Open Ephys, bomba para administração de PTZ (KD Scientific® KDS 100 Legacy Syringe Pump, Holliston, MA, EUA) e um estimulador elétrico monofásico (Digitimer® DS3 Constant Current Stimulator, Welwyn Garden City, Hertfordshire, Reino Unido) acoplado a um Arduino ESP, conforme mostrado na Figura 4D. O último foi programado para entregar pulsos de ativação a cada 0,5 segundo (2 Hz) ao estimulador, que, por sua vez, foi configurado para produzir um estímulo elétrico de 100 μ s com amplitude de 0,6 mA.

Para os registros, foi utilizada uma frequência de amostragem de 5 kHz e cada experimento foi gravado por uma câmera digital (Microsoft® Lifecam VX-700, Redmond, WA, EUA). Para eliminar contaminações no sinal registrado, foi utilizada uma bateria de 12 V para alimentar o Arduino e todo o sistema foi devidamente aterrado na gaiola de Faraday. Além disso, coletaram-se também amostras dos momentos de disparo de estimulação do Arduino, por meio da porta de entrada digital do Open Ephys, a fim de sincronizar o iEEG com os estímulos elétricos.

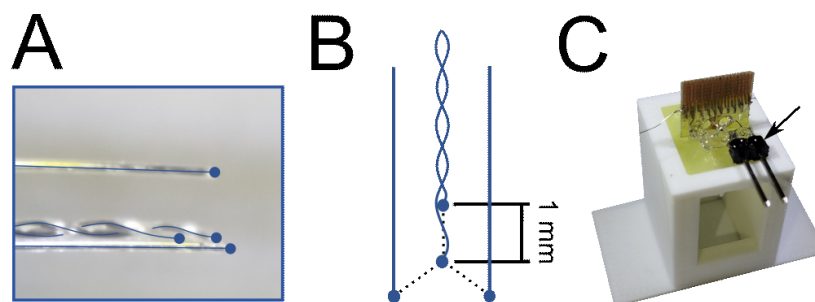


Figura 5 - Configuração dos eletrodos de registro das matrizes do protocolo experimental 1.

(A) Conjunto de VEEG (eletrodos referentes ao registro de um dos conjuntos do Hipocampo direito). Em azul estão destacados os eletrodos utilizados para o registro do iEEG. (B) Esquema de construção do conjunto de VEEG. (C) Exemplo de uma matriz utilizada durante a execução do protocolo experimental (Animal 03). O conector para a estimulação elétrica da Amígdala esquerda está indicado pela seta preta.

Inicialmente, registrou-se a atividade basal por 5 minutos. Em seguida, fez-se um segundo registro de atividade basal, agora com a estimulação elétrica da amígdala basolateral esquerda. A estimulação foi então desligada, e o animal teve o acesso venoso conectado à uma seringa de 20 mL por um tubo de silicone. Nesse momento, iniciou-se um novo registro e, após 1 minuto, ligou-se simultaneamente a estimulação e a bomba de infusão, aplicando ao animal 10 mg/mL de PTZ (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) diluído em salina a uma taxa de 1 mL/min.

A administração de PTZ foi interrompida após a identificação da primeira crise eletrográfica, permanecendo apenas a estimulação elétrica. Ao final de 20 minutos contados do início da administração do PTZ, o registro foi encerrado. Os ratos foram eutanasiados e perfundidos por aplicação intracardíaca de tampão fosfato seguido de paraformaldeído 4%. Por fim, os cérebros foram retirados, desidratados em solução de sacarose 20% e posteriormente processados para a análise histológica de confirmação de posicionamento dos eletrodos.

Foram submetidos ao protocolo cirúrgico 10 animais, nomeados de 001 a 010. Todos sobreviveram à cirurgia, entretanto, em 5 dos animais testados não foi possível fazer a administração do PTZ pela impossibilidade de acessar a veia caudal lateral. Os animais que obtiveram sucesso em todas as etapas descritas (n = 5) foram utilizados nas análises subsequentes.

3.6. Protocolo experimental 2 - ácido caínico

O desenho experimental, mostrado pelas Figuras 6A e 6B, foi conduzido em quatro etapas principais, sendo elas: (1) procedimento cirúrgico para inserção dos eletrodos de registro descrito anteriormente, (2) registro de iEEG da atividade basal, (3) registro de iEEG do status epilepticus após a administração de ácido caínico intrahipocampal e, por fim, (4) eutanásia dos animais e estudo histológico para confirmação do posicionamento dos eletrodos.

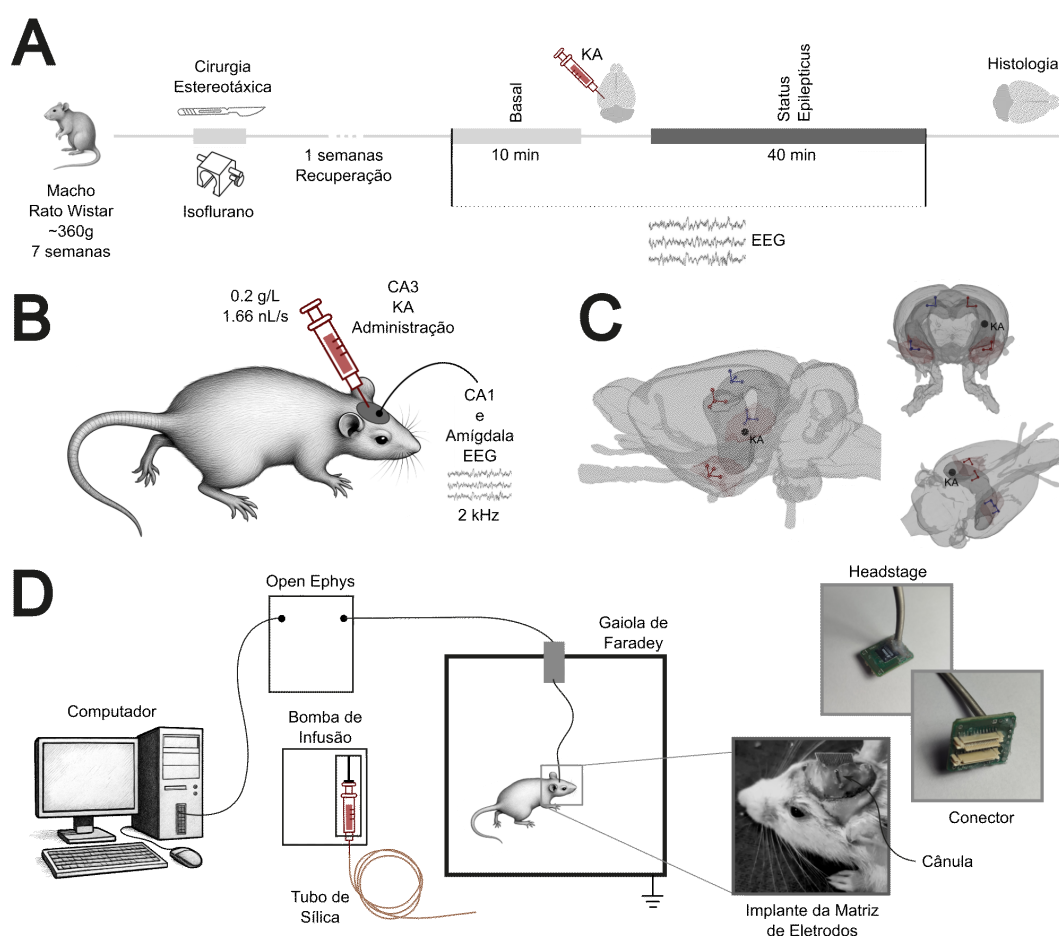


Figura 6 - Etapas do protocolo experimental 2.

(A) Descrição do Protocolo 2. (B) Esquemático das características da administração de KA e registro do iEEG. (C) Posicionamento dos eletrodos de registro e da cânula para administração do KA. (D) Configuração da sala durante o experimento. À direita estão representados exemplos do capacete do animal após a cirurgia e do headstage/conector utilizados para a aquisição do iEEG.

A execução do protocolo envolveu o implante de 16 eletrodos para o registro do VEEG em quatro áreas alvo: região CA1 dos hipocampus direito e

esquerdo e núcleo basolateral das amígdalas direita e esquerda. O status epilepticus foi induzido localmente pela administração de ácido caínico na região CA3 do hipocampo esquerdo, através de uma cânula guia. Assim como no protocolo anterior, os alvos foram escolhidos por possuírem relevância nos processos ictogênicos e epileptogênicos gerados pelo modelo focal de ELTM e as coordenadas correspondentes estão apresentadas pela Tabela 2 e Figura 6C acima (Paxinos & Watson, 2013).

Tabela 2 - Coordenadas estereotáxicas para inserção dos eletrodos de registro e da cânula guia do protocolo experimental 2.

Área	VEEG	Médio-lateral	Anteroposterior	Dorsiventral
Amígdala Esquerda	Central	-5,00	-2,52	-8,80
	Eixo X	-4,00	-2,52	-8,80
	Eixo Y	-5,00	-3,52	-8,80
	Eixo Z	-5,00	-2,52	-7,80
Amígdala Direita	Central	+5,00	-2,52	-8,80
	Eixo X	+4,00	-2,52	-8,80
	Eixo Y	+5,00	-3,52	-8,80
	Eixo Z	+5,00	-2,52	-7,80
Hipocampo Esquerdo	Central	-2,00	-2,70	-3,40
	Eixo X	-3,00	-2,70	-3,40
	Eixo Y	-2,00	-3,70	-3,40
	Eixo Z	-2,00	-2,70	-2,40
Hipocampo Direito	Central	+2,00	-2,70	-3,40
	Eixo X	+3,00	-2,70	-3,40
	Eixo Y	+2,00	-3,70	-3,40
	Eixo Z	+2,00	-2,70	-2,40
Cânula Guia		+4,30	-5,60	-5,50

As matrizes de eletrodos necessárias à execução do experimento também foram produzidas conforme a Seção 3.2. Utilizou-se apenas pares trançados de fios de aço inoxidável revestidos com PFA 791400 (50,8/114,3 µm de diâmetro do fio/PFA, AM Systems Inc.®, Carlsborg, WA, EUA) com 8 voltas por centímetro. Em um terço dos pares trançados, os fios foram afastados de 1 mm para criar a conformação tridimensional de cada conjunto de VEEG (Figuras 7A e 7B). Neste caso, para cada conjunto, três pares trançados foram utilizados, sendo apenas quatro dos eletrodos efetivamente soldados à placa de conexão.

Além disso, a cânula guia G22 de 1,5 cm foi colada à base da matriz com super cola. Para melhor fixá-la foi feita uma gota de solda em sua superfície, que posteriormente foi coberta por epóxi. Por fim, adicionou-se em cada cânula um fio de aço para ocluir a passagem de sujeiras e evitar infecções. As Figuras 7C, 7D e 7E mostram uma matriz concluída, note que nas duas últimas representações a cânula está indicada por uma seta.

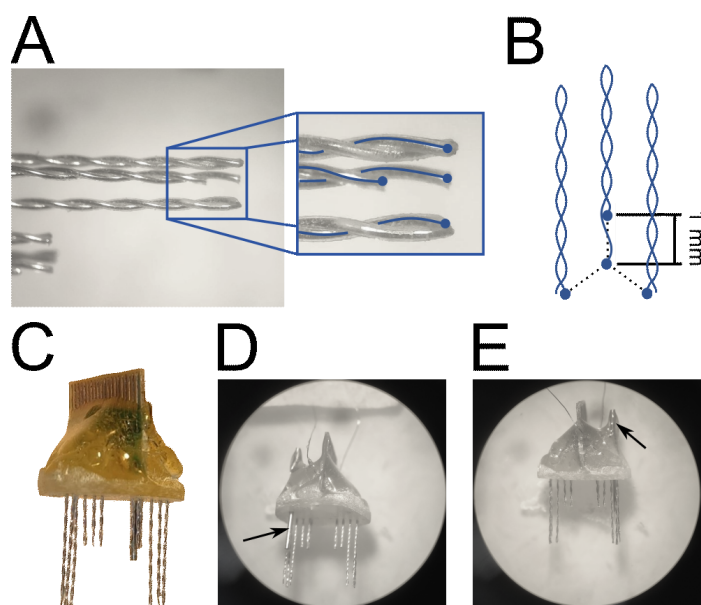


Figura 7 - Configuração dos eletrodos de registro das matrizes do protocolo experimental 2. (A) Conjunto de VEEG (eletrodos referentes ao registro da Amígdala esquerda). Em azul estão destacados os eletrodos utilizados para o registro do iEEG. (B) Esquema de construção do conjunto de VEEG. (C a E) Exemplos de uma matriz utilizada durante a execução do protocolo experimental (Animal 04). A cânula para a administração de KA está indicada pela seta preta.

Os animais foram submetidos, uma semana após o procedimento cirúrgico, ao registro da atividade basal durante 30 minutos para a obtenção do sinal de controle e verificação da viabilidade dos eletrodos implantados. Em seguida, foram induzidos ao *status epilepticus* pela administração de 0,4 μg de ácido caínico em 0,2 μL de cloreto de sódio 0,9% (Raedt et al., 2009).

A aplicação da droga, controlada por uma bomba de infusão (KD Scientific® KDS 100 Legacy Syringe Pump, Holliston, MA, EUA), foi efetuada da seguinte maneira: (1) introduziu-se, através da cânula guia, um tubo de sílica conectado a uma seringa Hamilton® de 1 mL, (2) injetou-se o conteúdo da seringa durante dois minutos, (3) aguardou-se por 1 minuto a difusão do ácido caínico, (4) retirou-se a sílica cuidadosamente e (5) reconectou-se o

animal ao sistema de eletrofisiologia. Após a administração, registou-se por 2 horas o *status epilepticus*.

Assim como no experimento anterior, os registros foram efetuados, por meio do sistema de aquisição de sinais da Open Ephys. O *headstage* foi fixado a uma gaiola de acrílico por meio de um comutador de forma a permitir a livre movimentação do animal durante o experimento. O aparato, encapsulado por uma gaiola de Faraday para a supressão de ruídos, foi devidamente ligado a um computador externo, responsável pelo armazenamento dos dados coletados. O desenho esquemático da configuração do experimento está representado pela Figura 6D.

Nas etapas de registro da atividade basal e do *status epilepticus* induzido, os sinais de iEEG foram amostrados a uma frequência de 2 kHz. Além disso, todos os experimentos foram simultaneamente filmados por uma câmera digital (Microsoft® Lifecam VX-700, Redmond, WA, EUA). Ao final do período de registro, os ratos foram eutanasiados por administração intraperitoneal de cetamina 30 mg/Kg e 1,5 mg/Kg de xilazina e perfundidos por aplicação intracardíaca de tampão fosfato seguido de paraformaldeído 4%. Por fim, os cérebros dos animais foram retirados, desidratados em solução de sacarose 20% e posteriormente processados para a análise histológica de confirmação de posicionamento dos eletrodos. Foram submetidos ao protocolo cirúrgico 13 animais, nomeados de 001 a 013. Desses, sete sobreviveram à cirurgia e foram utilizados durante o período do protocolo experimental.

3.7. Análise e processamento de sinais

O desenho experimental e os objetivos dos dois experimentos descritos acima (Protocolo 1 e Protocolo 2) são distintos, logo, as análises foram específicas para cada um dos protocolos. Entretanto, uma grande parte das funções aplicadas a um conjunto de dados, também foi aplicada ao outro, principalmente aquelas de pré-processamento. Sendo assim, o desenho das análises foi pensado para compartilhar o máximo de rotinas entre os experimentos e, para isso, foram desenvolvidas diversas classes programadas em Python.

A seção que se segue será também compartimentalizada, seguindo a lógica de construção das rotinas de análise: (1) pacote para análise de iEEG; (2) pacote para análise de VEEG; (3) pacote para identificação de trajetórias; (4) análise do Protocolo 1; e (5) análise do Protocolo 2.

3.7.1. Pacote de análise de iEEG

Inicialmente foi desenvolvida uma classe, chamada de *leegClass*, para a leitura de iEEG que pudesse ser ao mesmo tempo geral e escalável. Obviamente, utilizou-se funções de leitura de arquivos do Open Ephys, da biblioteca *openephys-python-tools*, uma vez que os dados foram coletados por esta plataforma.

Cada instância da classe, relacionada a um único animal, foi declarada com dois principais parâmetros: (1) um arquivo .txt padronizado contendo uma breve descrição dos dados do experimento; e (2) uma lista com os nomes dos canais registrados. O primeiro está exemplificado pela Figura 8A abaixo e foi anexado junto a cada conjunto de dados de cada animal, descrevendo o caminho dos registros (Figura 8B), seus respectivos períodos dentro do protocolo e a referência de posicionamento da conexão do *headstage*.

O segundo atributo é derivado da montagem da matriz de eletrodos, na qual cada canal é atribuído a uma região no cérebro, formando um mapa de conexões, que deve ser passado ao sistema para a correta configuração da análise. Como o *headstage* utilizado possui 32 canais - distribuídos em dois conectores SMD/FPC, correspondentes aos canais de 1 a 16 e de 17 a 32 como pode ser observado na Figura 8C - e pode ser conectado em duas direções (Figura 8D), existem quatro mapas possíveis. Sendo assim, é relevante que a referência de posicionamento do *headstage* esteja em conformidade com a lista de canais fornecida.

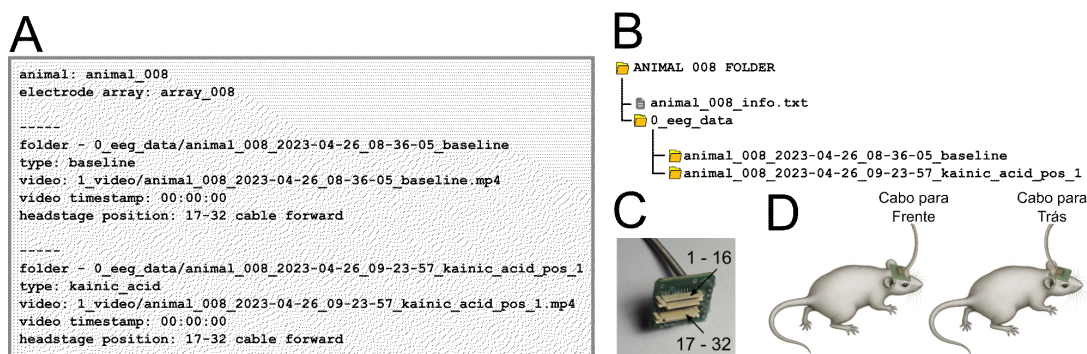


Figura 8 - Requisitos necessários para a leitura dos arquivos de iEEG.

(A) Exemplo do arquivo de texto usado como parâmetro para a criação da classe de análise (Animal 08 do Protocolo 2). (B) Exemplo do diretório relacionado ao arquivo de texto da Figura 8A (Animal 08 do Protocolo 2). (C) Disposição dos conectores dos canais no headstage. (D) Possíveis posicionamentos do headstage em relação à direção de conexão.

As instâncias da classe agrupam os dados das etapas do protocolo de cada animal, assim como vários atributos relevantes à análise, como nome do animal, nome dos canais, frequência de amostragem, tamanho do registro, entre outros. Além dos atributos, a classe fornece cerca de 25 métodos direcionados ao pré-processamento dos sinais, contendo funções como reamostragem, filtro, recorte, organização de canais e visualização. Além disso, a classe ainda conta com métodos de armazenamento e leitura, que permitem com que etapas pré-processamento possam ser carregadas pela classe posteriormente.

O método *inspect_and_label_data* é especialmente relevante, nele, uma outra classe denominada *DataLabelingClass* é momentaneamente instanciada, permitindo que o experimentador inspecione o dado e faça marcações de recortes importantes para a análise do registro, como por exemplo períodos de interesse ou ruídos.

Todos os períodos de crise foram identificados neste trabalho por meio da funcionalidade de inspeção mencionada anteriormente. A identificação foi realizada manualmente, considerando eventos de iEEG nos quais pelo menos um dos canais registrou espículas repetidas com amplitude superior a três vezes o desvio padrão basal, em valor absoluto. O início de cada crise foi marcado a partir da primeira espícula de uma sequência identificada, enquanto o término foi definido pela última espícula registrada antes de um

intervalo de atividade reduzida, dentro dos limites de mais/menos 3 desvios padrões do basal.

3.7.2. Pacote de análise de VEEG

Para a obtenção do VEEG é necessário, como descrito na seção 3.1, três aspectos relacionados ao desenho experimental: (1) posição dos eletrodos em relação ao bregma, (2) o conjunto de eletrodos que forma um único VEEG e (3) a posição de cada eletrodo em relação aos eixos ortogonais tridimensionais, ou seja, qual eletrodo corresponde a qual eixo (X, Y, Z, ou central).

Criou-se, então, a classe *VeegClass*, que herda atributos e métodos da classe *leegClass* e acrescenta as três informações citadas acima através de parâmetros inseridos na criação do objeto. De forma complementar, criou-se a classe *VectorClass*, que é alimentada pelos atributos da classe *VeegClass* e calcula o VEEG por meio dos dados de iEEG aplicados às Equações de 1 a 7.

A instância do *VectorClass* fica atrelada à classe *VeegClass* como um atributo e pode ser acessada pelo experimentador para aquisição dos dados de VEEG e aplicação de métodos como, por exemplo, cálculo da magnitude vetorial. Entretanto, ao longo da análise objetos da *VectorClass* também foram usados de forma isolada, para criar vetores de segmentos de registro de forma independente.

3.7.3. Pacote de análise para identificação de trajetórias

Uma vez que o objeto da classe *VeegClass* é instanciado, nele estão todas as informações relevantes para a análise dos vetores e trajetórias de VEEG. Destacam-se as duas mais relevantes: (1) os dados de iEEG guardados em uma matriz $N_{ch} \times N_s$, sendo N_{ch} o número de canais e N_s o número de amostras; e (2) os dados vetoriais guardados em uma matriz $N_{cj} \times 3 \times N_s$, sendo N_{cj} o número de conjuntos de VEEG e N_s , novamente, o número de amostras. Note que a segunda dimensão da última matriz corresponde às três dimensões espaciais (X, Y e Z).

Como mencionado anteriormente, o módulo (ou magnitude) do vetor está atrelado à posição e à intensidade de um ou dos vários dipolos que afetam os eletrodos registrados. Portanto, pode-se imaginar que circuitos aberrantes e repetitivos formem padrões de trajetórias também repetitivas e de amplitude elevada em pelo menos algum conjunto de VEEG. Logo, é intuitivo que o módulo vetorial ($m(t)$), apresentado pela Equação 9, seja um bom indicador de padrões de ativação durante o período experimental. Novamente, $E_{VEEG}^{\rightarrow}(t)$ representa o VEEG, enquanto $\|\cdot\|_2$ é a norma vetorial.

$$m(t) = \left\| E_{VEEG}^{\rightarrow}(t) \right\|_2 \quad (9)$$

Sendo assim, a classe *VeegLabelingClass* foi produzida para a identificação de padrões de trajetórias através de sua magnitude, que pudessem fornecer informações acerca da dinâmica de recrutamento de circuitos durante a ictogênese. As funcionalidades da classe se assemelham às descritas para a *DataLabelingClass*, pois também utiliza de uma interface interativa para a marcação de segmentos de interesse, com a diferença de apresentar apenas a magnitude de um conjunto de VEEG por vez.

A Figura 9 apresenta o processo de identificação de trajetórias. Na Figura 9A está a especificação anatômica do conjunto de VEEG TL1 do Animal 02 do Protocolo 1 utilizado no exemplo. Ligado aos elementos que compõem a vetorização do sinal estão: (1) o sinal de iEEG pré-ictal com destaque para os 4 canais que o compõem o tetraedro exemplificado; (2) o mesmo trecho do registro convertido em VEEG, representado pelas séries temporais correspondentes aos eixos X, Y e Z do conjunto TL1; e (3) a magnitude resultante do vetor.

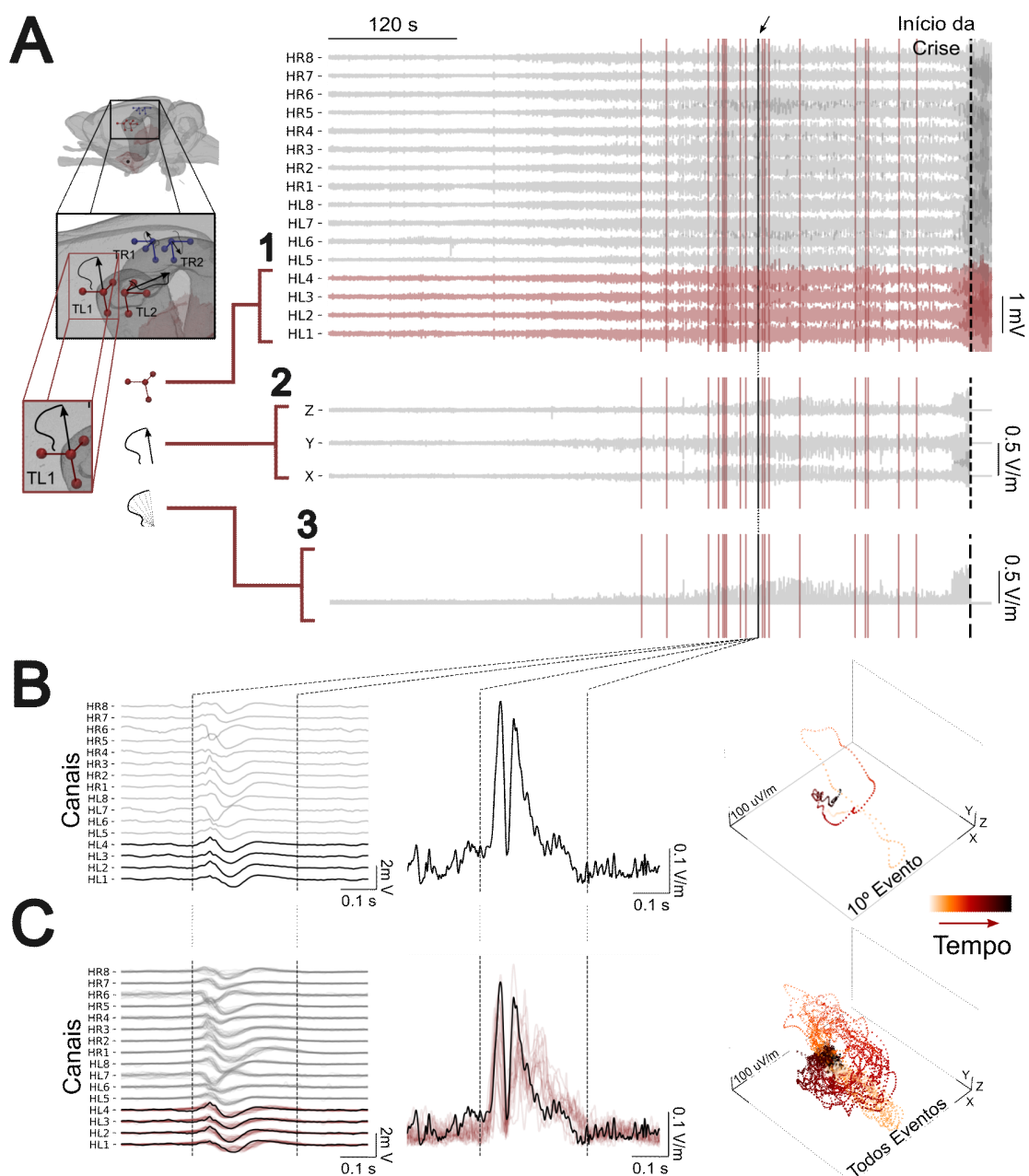


Figura 9 - Exemplo do processo de identificação de *clusters* de trajetórias de VEEG.

(A) À esquerda está a representação anatômica do tetraedro TL1 do Animal 02 do Protocolo 1 usado como exemplo. À direita estão o registro de iEEG (1), VEEG (2) e magnitude do VEEG (3) correspondentes. As linhas verticais pretas e a seta indicam o décimo evento do *cluster* 3, enquanto as linhas verticais vermelhas indicam os demais eventos do *cluster* 3. (B) Os painéis representam, respectivamente, o sinal de iEEG, magnitude da trajetória de VEEG e a trajetória de VEEG correspondentes à identificação do décimo evento do *cluster* 3. (C) Os painéis representam, respectivamente, os sinais de iEEG, magnitudes das trajetórias de VEEG e as trajetórias de VEEG correspondentes aos eventos do *cluster* 3. Em preto, nos dois primeiros painéis, está identificado o décimo evento.

Para a identificação de eventos foram selecionados manualmente aqueles padrões eletrográficos de magnitude vetorial com pelo menos uma amostra acima de 3 vezes o desvio padrão do basal. Após a seleção de um trecho, como o apresentado pela Figura 9B e destacado na Figura 9A por uma seta e pelas linhas pretas verticais, a classe é capaz de deflagrar uma sequência de comandos para identificar trajetórias semelhantes ao longo de todo o registro. O algoritmo opera com a biblioteca STUMPY (Law, 2019), que aplica correspondência de padrões através da distância euclidiana entre um segmento alvo normalizado e segmentos normalizados da série temporal definidos por uma janela deslizante de mesmo tamanho.

Para aumentar a precisão de classificação de trajetórias, utilizou-se correspondência de padrões multidimensional, composta pela magnitude vetorial (Equação 9 e Figura 9B) e pelas séries temporais representadas pelas Equações 4, 5 e 6. Em outras palavras, o algoritmo foi programado para apontar padrões de trajetórias que fossem equivalentes em quatro dimensões concomitantemente: X, Y, Z e magnitude.

Uma vez executado o código de identificação, os padrões semelhantes encontrados foram agrupados em *clusters* e atribuídos em uma terceira classe denominada *ClusterClass*, responsável por administrar os segmentos do registro e formatá-los para as análises posteriores. A Figura 9C apresenta um exemplo de *cluster* de trajetórias, que agrupa, dentre outras, a trajetória mostrada na Figura 9B.

3.7.4. Análise do Protocolo 1 - a dinâmica do ERP durante processo ictogênico

Em uma primeira etapa avaliou-se a existência de um potencial evocado relacionado ao estímulo. Para isso, apenas os dados do registro basal foram utilizados e passaram por alguns pré-processamentos: (1) os trechos de ruído foram marcados manualmente e removidos, (2) foi aplicado ao registro um filtro rejeita-faixa de 60 Hz e um passa-faixa de 1 a 300 Hz e (3) os trechos de estimulação foram separados em pacotes de duração de -0,5 segundo a 1,5 segundo em relação ao estímulo.

Em cada segmento de iEEG correspondente a um estímulo caracterizou-se o sinal dos diferentes canais pelos parâmetros: (1) atraso entre o primeiro ponto de inflexão e o estímulo, (2) atraso entre o primeiro pico positivo e o estímulo e (3) amplitude do primeiro pico após o estímulo, como pode ser observado pela Figura 11A. O objetivo da seleção foi diferenciar o ERP de um ruído típico, mostrando que o sinal registrado apresenta características inerentes aos relés sinápticos da via registrada e diferentes entre os eletrodos. Isso porque, conforme mencionado na Seção 1, a propagação de um potencial evocado no encéfalo relaciona-se às vias anatômicas (com o atraso primariamente devido ao processo de transmissão sináptica em cada ponto do circuito) e a distância entre o eletrodo e a fonte de atividade do dipolo bioelétrico gerado (afetando a amplitude do sinal registrado), diferentemente de um ruído, que geralmente possui modo comum e atraso zero (Buzsáki et al., 2012). Vale ressaltar que a propagação de um campo elétrico dentro do encéfalo se faz na velocidade da luz, os atrasos acontecem se os múltiplos dipolos (correspondentes a cada relé sináptico) forem acionados em tempos diferentes; onde geradores mais próximos ao registro teriam maior amplitude se mantida a orientação do dipolo gerador.

Após coletar os parâmetros acima, foram calculados, para os canais de cada animal, o desvio padrão do atraso dos primeiros pontos de inflexão e dos primeiros picos positivos. Com valores obtidos compararam-se os parâmetros em termos de sua variância por teste T ou Wilcoxon (a depender da normalidade testada com o teste de Shapiro-Wilk), seguidos de correção Benjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR-BH) para mitigar erros do tipo I, os resultados estão apresentados pela Figura 11B.

Em seguida, comparou-se canal a canal a diferença entre as distribuições dos parâmetros de amplitude e atraso do primeiro pico por meio do teste de ANOVA de uma via ou Friedman e posteriormente aplicou-se comparações *post hoc* teste T ou Wilcoxon com correção FDR-BH. Por fim, utilizando o mesmo método citado anteriormente, agruparam-se os canais por conjunto de VEEG e aplicou-se os mesmos testes.

Para a visualização das comparações, construiu-se matrizes referentes aos canais ou aos conjuntos de VEEG, conforme mostrado pelos painéis da Figura 11C. O mapa de cor reflete a mediana da distribuição obtida pela

subtração entre atrasos/amplitudes registrados em cada ERP, para cada par de canais ou par de conjunto de VEEG. No eixo vertical estão eletrodos ou conjuntos de eletrodos de referência, enquanto na horizontal estão eletrodos ou conjuntos de eletrodos de comparação. Valores negativos (em azul) indicam que a referência no eixo vertical possui magnitudes menores do que aquelas encontradas para a referência no eixo vertical, enquanto valores positivos (em vermelho) indicam o oposto. Exemplificando, se os picos positivos de um canal de referência ocorrerem, em média (mediana), antes que os picos em outro canal, a cor da matriz referente a esse par de canais deve ser azul. Por outro lado, se as amplitudes dos picos positivos desse canal de referência forem, em média (mediana), maiores que os de um canal de comparação, a cor correspondente na matriz deve ser vermelha. Note que somente estão mostrados os resultados para o primeiro pico positivo, uma vez que não foi encontrada diferença estatística em relação aos parâmetros do primeiro ponto de inflexão.

Na segunda etapa de análise, foram aplicados aos dados de todos os períodos do protocolo os seguintes pré-processamentos: (1) períodos de ruído foram identificados manualmente e removidos, (2) as crises eletrográficas foram identificadas manualmente, (3) foi aplicado ao registro um filtro rejeita-faixa de 60 Hz e um passa-faixa de 1 a 300 Hz, (4) os trechos de estimulação foram separados em pacotes de duração de -0,5 segundo a 1,5 segundo em relação ao estímulo e, por fim, (5) agrupou-se os trechos de iEEG em janelas móveis de 5 trechos de estimulação consecutivos, com uma sobreposição de 4 trechos, resultando em uma matriz de dimensões $N_{ch} \times N_{jn} \times 5 \times N_{str}$. Sendo N_{ch} o número de canais, N_{jn} o número de janelas de trechos de estimulação e N_{str} o número de amostras por trecho (2 segundos, a uma frequência de amostragem de 5 kHz).

Utilizando a matriz construída, calculou-se outras três matrizes: (1) uma contendo a potência instantânea do ERP médio das janelas móveis, com dimensões $N_{ch} \times N_{jn} \times N_{str}$, (2) uma matriz correspondente contendo a magnitude da trajetória média por janela em cada conjunto de VEEG, com dimensões $N_{cj} \times N_{jn} \times N_{str}$ e (3) uma matriz de dispersão angular dos vetores de VEEG por janela, com dimensões $N_{cj} \times N_{jn} \times N_{str}$, sendo N_{cj} o número de conjuntos de VEEG.

A potência instantânea da janela ($p[n]$), a magnitude vetorial da janela ($m[n]$) e a dispersão angular da janela ($d[n]$) estão explicitadas pelas Equações 10, 11 e 12 respectivamente, nas quais n é a amostra definida pela Equação 13, t o tempo, T_s o tempo de amostragem, $f[n]$ um sinal qualquer, $E_{VEEG_j}^{\rightarrow}[n]$ o VEEG da janela j , $V_j[n]$ o EEG da janela j e k o número de trechos por janela (5 trechos).

$$p[n] = \left[\frac{1}{k} \sum_{j=1}^k V_j[n] \right]^2 \quad (10)$$

$$m[n] = \left\| \frac{1}{k} \sum_{j=1}^k E_{VEEG_j}^{\rightarrow}[n] \right\|_2 \quad (11)$$

$$d[n] = 1 - \left\| \frac{1}{k} \sum_{j=1}^k \frac{E_{VEEG_j}^{\rightarrow}[n]}{\left\| E_{VEEG_j}^{\rightarrow}[n] \right\|_2} \right\|_2 \quad (12)$$

$$f[n] = f(t)|_{t=nT_s} \quad (13)$$

Para simplificar o estudo e evitar redundância de informação, restringiu-se a análise aos canais de iEEG correspondentes aos eletrodos centrais dos conjuntos de VEEG. Portanto, N_{ch} se igualou a N_{cj} , com quatro dimensões, uma vez que o desenho experimental define quatro conjuntos de VEEG. Por fim, as matrizes (1) e (2) foram normalizadas pelo *z-score* do período basal do registro. Os parâmetros aqui obtidos estão representados pelos conjuntos de VEEG HL1 e HL2 do Animal 06 na Figura 12A.

Com as matrizes, calculou-se a média das amostras (N_{str}) de cada janela (N_{jn}) para cada um dos três parâmetros (potência instantânea, magnitude vetorial e dispersão angular). Dessa forma, obteve-se um sinal $N_{cj} \times N_{jn}$ para cada matriz, representativo da atividade geral de cada janela por conjunto de VEEG. Foram obtidas as médias e desvios padrões dos sinais correspondentes às janelas do período basal para cada parâmetro e, em

seguida, utilizou-se a matriz completa para identificar a primeira sequência de 5 janelas a apresentar valores maiores que três desvios padrões do basal. Sendo assim, para os conjuntos de VEEG de cada animal, foi associada uma janela com limiar de atividade para cada um dos parâmetros analisados, essa, por sua vez, foi convertida em tempo (primeiro segundo da primeira janela da sequência) que posteriormente foi relacionado ao início da crise.

Os dados foram agrupados e comparados em relação à primeira crise de duas maneiras: por tempo relativo e por gramas de PTZ por quilograma de animal, conforme mostrado pelas Figuras 11B e 11C respectivamente. Em ambos os casos os parâmetros foram comparados para cada conjunto de VEEG usando teste ANOVA de medidas repetidas ou Friedman (com comparações *post hoc* Tukey *honestly significant difference*, Tukey HSD, ou Conover, respectivamente) e os parâmetros entre os conjuntos de VEEG usando ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis (com comparações *post hoc* Tukey HSD ou Dunn, respectivamente).

Após concluída a análise acima, adotou-se uma segunda estratégia para estudar o comportamento dos parâmetros entre os períodos do protocolo. Inicialmente, foi aplicada uma binarização às matrizes de potência instantânea, magnitude e dispersão angular. Para as duas primeiras foi atribuído 1 para valores acima de três vezes o desvio padrão do basal e 0, caso contrário. Já para a última matriz foi atribuído 1 para valores menores do que 0,3, correspondendo a uma variância angular de aproximadamente 40°, e 0 no cenário oposto. Em seguida, os registros foram recortados para não ultrapassarem o início de uma segunda crise, caso existente, e, por fim, o sinal foi dividido em 5 períodos: (1) basal, que antecede a administração de PTZ; (2) PTZ, durante a administração de PTZ; (3) pré-ictal, definido pelo tempo precedente à crise (de mesma duração que a própria crise); (4) ictal; e (5) pós-ictal, contabilizado do final da crise até a última amostra considerada. A Figura 13 mostra a divisão e exemplifica as janelas de ERPs utilizadas, enquanto a Figura 14A apresenta as matrizes referentes aos três parâmetros do conjunto de VEEG HL1 do Animal 06 e, à direita, exemplifica a divisão dos períodos do registro com a matriz de dispersão angular.

Das matrizes binarizadas, calculou-se a porcentagem de amostras acima do limiar para cada período. Sendo assim, atribuiu-se um valor de

porcentagem, que resultou em um sinal $N_{cj} \times N_{jn}$ para cada animal, para cada parâmetro. Em seguida, aplicou-se um método estatístico semelhante ao anterior, agrupou-se os resultados dos animais e comparou-se, para cada parâmetro, os períodos registrados por um mesmo conjunto de VEEG usando teste ANOVA de medidas repetidas ou Friedman (com comparações *post hoc* Tukey HSD ou Conover, respectivamente), a depender do teste de normalidade Shapiro-Wilk. Além disso, também verificou-se a diferença dos períodos entre os conjuntos de VEEG usando ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis (com comparações *post hoc* Tukey HSD ou Dunn, respectivamente), novamente a depender do teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os resultados estão representados pela Figura 14C.

Ainda, comparou-se, dois a dois, a relação entre as medidas de porcentagem dos diferentes parâmetros, conforme apresentado pela Figura 14B. Para isso, todos os valores foram agrupados de forma pareada (mesmo período, conjunto de VEEG e animal) e a correlação de Pearson foi medida entre os parâmetros.

O próximo passo foi dividir a análise anterior não somente por período do protocolo, mas também em relação ao período que compreende o sinal de ERP, como mostrado pelo painel à direita na Figura 14A. Para isso, escolheu-se arbitrariamente dividir cada janela de ERP em 4 segmentos, resultando em trechos de 0,5 segundo, uma vez que a distância entre estímulos é de 2 segundos. Para a análise estatística, mostrada na Figura 14D, os valores de cada animal foram agrupados, de acordo com os parâmetros de análise, conjunto de VEEG, período do experimento e período relacionado ao estímulo. Aplicou-se, então, uma comparação entre os períodos do ERP dentro de cada período do protocolo (basal, administração de PTZ e outros) utilizando ANOVA de medidas repetidas ou Friedman (com comparações *post hoc* Tukey HSD ou Conover, respectivamente). Em seguida, foram comparados os períodos do ERP entre os diferentes períodos do protocolo com os mesmos testes estatísticos citados na análise anterior. É importante ressaltar que, nesse caso, apenas as diferenças em relação ao basal foram mostradas no gráfico para simplificar a visualização das diferenças. Por fim, comparou-se cada partição em relação aos diferentes eletrodos utilizando ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis (com comparações

post hoc Tukey HSD ou Dunn, respectivamente). Mais uma vez, para simplificação da visualização, os resultados para esse último teste foram ocultados. Os conjuntos de testes estatísticos ligados por conjunção (“ou”) foram aplicados a depender de testes de normalidade Shapiro-Wilk

3.7.5. Análise do Protocolo 1 - identificação de circuitos por padrões de trajetórias

Após finalizar o estudo do ERP, a análise se concentrou em identificar e classificar os circuitos envolvidos durante o processo ictogênico. Desta vez, aplicou-se os seguintes passos de pré-processamento: (1) os trechos de ruído foram marcados manualmente, (2) os períodos de crise eletrográfica foram identificados manualmente, (3) foi aplicado ao registro um filtro passa-faixa de 2 a 100 Hz, (4) o sinal foi reamostrado em 1 kHz, (5) os sinais de ruído foram substituídos por interpolação, (6) o sinal foi cortado para compreender apenas 300 segundos após o final da primeira crise e, por fim, (7) o período de crise eletrográfica foi descartado pela complexidade e dificuldade de classificar os padrões registrados.

Em seguida, utilizou-se a interface gráfica da classe *VeegLabelingClass* e, do fim para o início do registro, identificaram-se manualmente padrões de magnitude de trajetória com amplitudes de pelo menos três vezes o desvio padrão basal. A inspeção de maneira invertida se deu após observar que os eventos no final do registro eram maiores e mais duradouros que os do início e, por serem mais complexos, optou-se por classificá-los primeiro.

Portanto, para cada conjunto de VEEG, de cada animal, os padrões foram identificados e classificados em *clusters* como descrito na seção 3.7.3. Uma vez classificados, foram subdivididos em pré-ictais e pós-ictais e analisados em relação a 4 aspectos: (1) quantidade de eventos, (2) quantidade de *clusters*, (3) quantidade de eventos por *cluster* e (4) tamanho dos eventos. Além disso, através da classe *ClusterClass*, também foram contabilizados os atrasos dos eventos identificados em relação ao estímulo mais próximo.

Para os casos de (1) a (2), Figuras 16A e 16B, os grupos de eventos pré-ictais e pós-ictais foram comparados através do teste de Wilcoxon unilateral à direita (ou seja, testando a hipótese de que o pré-ictal é maior que o pós-ictal). Para o caso (3), mostrado na Figura 16C, calculou-se primeiro a proporção de eventos pré-ictais em relação ao total, subtraiu-se 0,5 e comparou-se a distribuição obtida com Wilcoxon em relação à 0. Isso foi feito para mostrar que um evento que ocorre no pré-ictal, tem baixa probabilidade de ser identificado no pós-ictal e vice-versa, pois caso contrário, o resultado da proporção seria 50%.

Como as medidas anteriores testam a mesma hipótese, de que existe uma maior quantidade de circuitos competindo pelo controle do sistema antes da crise, do que depois, os p-valores foram corrigidos pelo método FDR-BH.

Para os dados de duração dos eventos, apresentados pela Figura 15D, comparou-se as distribuições utilizando o teste T ou Mann-Whitney U (a depender do teste de normalidade Shapiro-Wilk). Na sequência, os eventos foram organizados em relação ao estímulo mais próximo, gerando uma janela circular de -1 a 1 segundo. A partir dessa representação, mostrada nas Figuras 16E, aplicou-se uma janela móvel de 10 segundos (5 estímulos) e para cada iteração, com uma sobreposição de 8 segundos, calculou-se a aleatoriedade do atraso dos eventos em relação ao estímulo através do teste de uniformidade circular de Rayleigh. A quantidade de eventos por período é destacada pelas cores dos histogramas hexagonais bidimensionais.

Na sequência, decidiu-se analisar a dinâmica de progressão dos *clusters* para verificar a existência de grupamentos dominantes e a organização da sequência do recrutamento dos *clusters* ao longo do tempo. Para isso, construiu-se uma tabela com as colunas: (1) animal, (2) conjunto de VEEG, (3) rótulo do evento, (4) tempo de ocorrência do evento, (5) *cluster* do evento e (6) *cluster* do evento que sucedeu o evento. Novamente, separou-se a tabela em eventos pré-ictais e pós-ictais, e fez-se um *bootstrap* de 500 iterações selecionado aleatoriamente, para cada período, 30% dos eventos do menor conjunto de dados (pré-ictal ou ictal). Para os dados selecionados calculou-se a matriz de transferência (probabilidade de um *cluster* recrutar outro *cluster* em sequência) utilizando as colunas (5) e (6) e, em seguida, obteve-se a média da diagonal principal, com o objetivo de

quantificar qual a probabilidade de um *cluster* se recrutar recursivamente. Além disso, calculou-se também a entropia de Shannon relacionada aos *clusters* da amostra, para quantificar a aleatoriedade dos *clusters* (entropia alta indica muitos *clusters* diferentes e com igual probabilidade de aparição, enquanto uma entropia baixa indica dominância de um ou poucos *clusters*).

Em cada iteração do algoritmo de *bootstrap*, os resultados de média da diagonal da matriz de transferência e entropia foram guardados e posteriormente analisados estatisticamente pela aplicação do teste T pareado ou Wilcoxon para os parâmetros testados, seguido de correção FDR-BH. Os resultados estão mostrados nas Figuras 16F e 16G.

3.7.6. Análise do Protocolo 2

As características das análises aplicadas no Protocolo 2 se diferem daquelas observadas no Protocolo 1, descritas anteriormente. Isso se deve principalmente às hipóteses testadas, mas também à fatores como duração do experimento, diferentes regiões cerebrais registradas e ausência de estimulação elétrica, que guiou o estudo anterior e estabeleceu janelas de referência. Ainda, é de se notar que o Protocolo 2 não se concentrou no estudo de uma única crise, contendo uma maior diversidade de características eletrográficas.

Entretanto, o pré-processamento do sinal foi, de certa forma, semelhante: (1) os trechos de ruído foram marcados manualmente, (2) os períodos de crise eletrográfica foram identificados manualmente, (3) foi aplicado ao registro um filtro rejeita faixa de 60 Hz, seguido de um filtro passa-faixa de 2 a 100 Hz, (4) o sinal foi reamostrado em 1 kHz; (5) os dados de cada canal foram normalizados pelo registro basal e, por fim, (6) o sinal foi cortado para compreender somente 45 minutos seguintes à administração do ácido caínico.

Após o pré-processamento, os VEEGs foram obtidos para cada tetraedro, tiveram sua magnitude vetorial calculada e os eventos de trajetória foram selecionados automaticamente da seguinte forma: (1) para cada crise eletrográfica calculou-se um limiar de amplitude igual à média da magnitude vetorial mais duas vezes o desvio padrão; (2) também para cada crise,

identificou-se os picos acima desse limiar; (3) o início e o fim dos eventos foi, então, definido com base no vales adjacentes ao pico; (4) os eventos foram organizados de forma decrescente em relação à sua duração; e, por fim, (5) eventos redundantes foram eliminados, caso a correlação máxima da magnitude fosse superior a 0,97 em relação a qualquer outro evento.

Um a um, os eventos identificados foram submetidos ao processo de identificação de padrões semelhante ao descrito na Seção 3.6.3. A rotina foi idealizada de forma a alocar cada evento em um único *cluster*, sem que houvesse a possibilidade de múltiplas rotulagens. Por fim, cada agrupamento de eventos foi instanciado através da classe *ClusterClass* e armazenado para posterior análise. A Figura 10 abaixo representa esse processo através da identificação de grupos de trajetórias de VEEG, a Figura 10A apresenta os dados de iEEG e magnitude vetorial de cada conjunto do Animal 004. Estão destacadas em vermelho claro as crises definidas manualmente e com linhas horizontais pretas os limites de amplitude de cada uma das crises. A Figura 10B apresenta a seleção dos eventos a serem agrupados e a Figura 10C o gráfico de eventos de uma porção dos *clusters* caracterizados.

O mesmo processo foi aplicado aos dados de iEEG, naqueles canais centrais de cada conjunto de Vector-EEG. Para que a identificação de padrões pudesse ser realizada de forma semelhante à praticada nos dados de magnitude vetorial, padrões eletrográficos do iEEG foram identificados com base na potência instantânea do registro, contendo, portanto, somente valores positivos. A mesma tática de agrupamento descrita anteriormente foi aplicada e os dados dos *clusters* salvos para posterior análise.

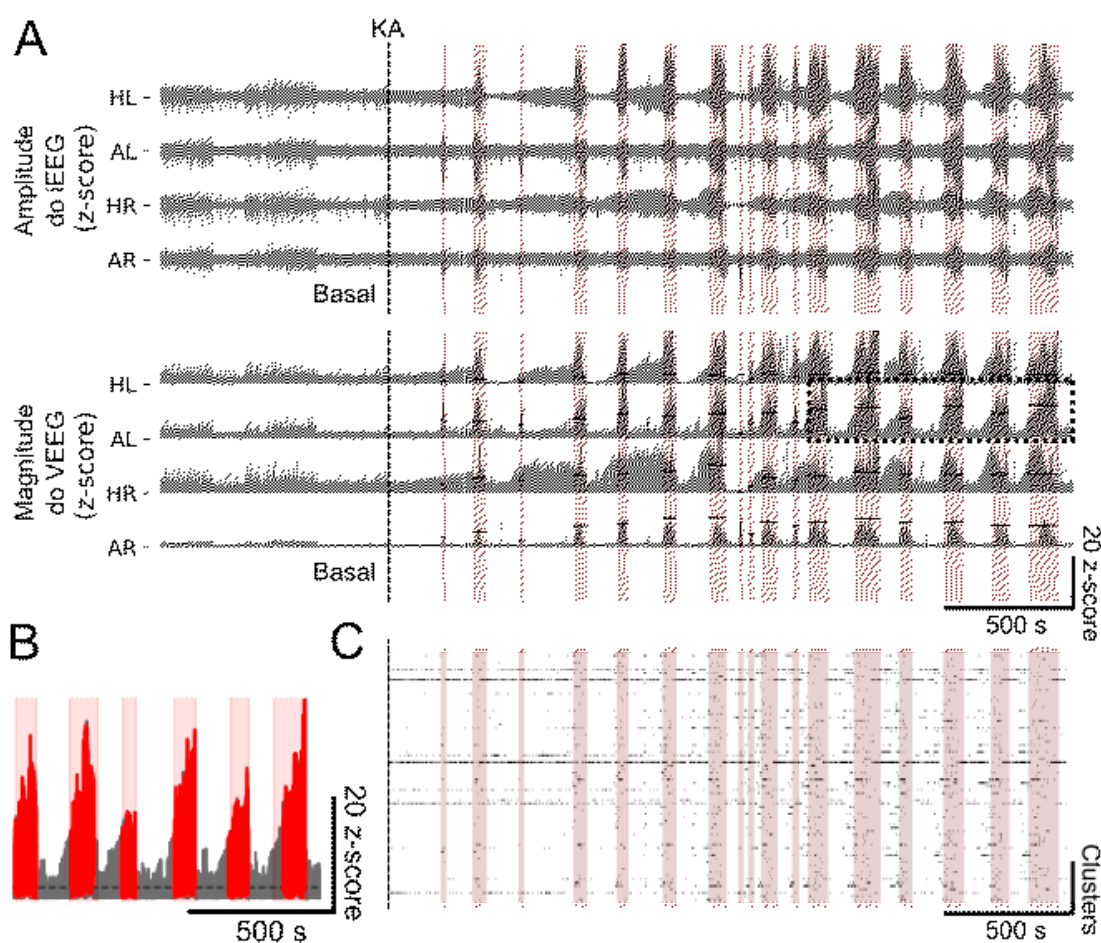


Figura 10 - Processo de identificação e agrupamento de eventos ictais, exemplificado pelo Animal 004 do Protocolo 2.

(A) Acima estão os registros de iEEG referente ao eletrodo central de cada tetraedro e abaixo, as respectivas magnitudes vetoriais. Janelas em vermelho claro indicam as crises, linhas pretas pontilhadas verticais representam a administração do KA e linhas pretas horizontais, os limiares de amplitude utilizados na identificação de picos. O retângulo pontilhado preto é a referência para o sinal apresentado no painel B. (B) Sinal da magnitude vetorial da amígdala esquerda com eventos identificados em vermelho (linha preta pontilhada representa a média do sinal). (C) Parte dos *clusters* identificados na amígdala esquerda. No eixo vertical estão os rótulos atribuídos a cada cluster e cada traço representa um evento de determinado *cluster*.

Devido à variabilidade no número de crises por animal, abrangendo de 2 a 17 eventos identificados, e no conseqüente número heterogêneo de *clusters* classificados, variando de 70 a 374, alguns critérios de análise precisaram ser estabelecidos. Inicialmente, considerou-se apenas aqueles animais com mais de 8 crises (foram eliminados 2 animais com 1 e 2 crises registradas). Ainda, todos os animais restantes ($n = 5$) foram avaliados em termos das suas 8 primeiras crises, por ser o mínimo de crises por animal

após o estabelecimento dos critérios. Dos animais selecionados, foram eliminados os eventos identificados cuja amplitude ou energia eram menores que 1,5 vezes o intervalo interquartil da distribuição e também foram desconsiderados aqueles *clusters* com menos de 3 eventos.

Inicialmente, os *clusters* e eventos identificados foram contabilizados por crise para cada tetraedro, conforme representado pelas Figuras 19A e 19B, para os dados de VEEG e iEEG respectivamente. Os resultados foram avaliados através da função *linregress* da biblioteca de estatística do SciPy, que implementa uma regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados para determinar a linha de melhor ajuste entre a mediana das proporções de cada crise e o número das sucessivas crises. Com esta biblioteca o p-valor foi calculado por teste T dividindo a inclinação estimada pelo seu erro padrão e os resultados foram corrigidos pelo método FDR-BH considerando todos os tetraedros e as avaliações por eventos e por *clusters*.

Os grupos de eventos de VEEG e iEEG foram rotulados separadamente com referência na probabilidade de ocorrência em relação ao início, meio e fim das crises identificadas, na tentativa de relacionar processos de gênese, sustentação e extinção, respectivamente. Para isso, foi feita a divisão de cada crise em três terços separados por um período correspondente a 25% da duração do evento ictal, de maneira a estabelecer um intervalo de confiança entre cada zona. Com a divisão estabelecida, em cada um dos *clusters*, os eventos foram contabilizados nas partições correspondentes e a distribuição avaliada da seguinte forma: (1) foram filtrados todos os *clusters* com pelo menos 3 eventos; (2) os valores de contagem dos eventos foram submetidos a um teste de Chi-Quadrado para ponderar a uniformidade da distribuição; (3) para aqueles não uniformemente distribuídos ($p < 0,05$), a zona de maior porcentagem de eventos foi testada também com Qui-Quadrado em relação às demais; (4) por fim, foi atribuído ao grupo de eventos a preferência de ocorrência nos casos novamente não uniformemente distribuídos ($p < 0,05$) e cuja proporção de atuação ultrapassou 0,28 ($[total - zona\ morta]/3$, ou $[1 - 0,2]/3$). A Figura 18A exemplifica o processo de rotulagem descrito, nela, estão representadas as estimativas normalizadas de densidade de *kernel* dos eventos dos *clusters*, com o objetivo de facilitar a visualização.

Calculou-se, então, a proporção de eventos em *clusters* com preferência de ativação por alguma janela de crise (abreviados como CPJC - *Clusters* com Preferência por Janela da Crise, para melhor compreensão do texto) em relação ao número total de eventos de cada região registrada e a proporção de CPJC e o número de *clusters* totais, também para cada região. Novamente, os dados foram avaliados através da função *linregress* e os resultados estão apresentados nas Figura 19C e 19D, respectivamente para classificação com VEEG e iEEG.

Na sequência, os *clusters* foram analisados sob duas perspectivas complementares, mostradas na Figuras 21A e 21B. Na primeira, cada tetraedro foi isolado e comparou-se a proporção de CPJC nos três diferentes terços da crise, no intuito de investigar a participação de cada região registrada na dinâmica do evento ictal. Na segunda, cada terço da crise foi isolado e comparou-se a proporção de CPJC entre as regiões registradas. Para ambas as abordagens, a normalidade das distribuições foi verificada com o teste Shapiro-Wilk. Conforme o resultado, foram utilizados testes ANOVA de medidas repetidas ou Friedman, com correção FDR-BH para comparações múltiplas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram detalhadas com testes *post hoc* T pareado ou Wilcoxon.

Finalmente, os dados de VEEG e iEEG foram relacionados quanto ao total de *clusters* e ao número de *clusters* com preferência de atividade, novamente a normalidade foi testada com o teste Shapiro-Wilk e, a depender do resultado, testes T pareado ou Wilcoxon foram usados seguidos de correção FDR-BH, conforme mostrado na Figura 21C.

Adiante, os *clusters* foram rotulados de acordo com a taxa de ocorrência em crises específicas, para analisar se alguma crise domina, de forma geral, a probabilidade de ocorrência de alguns *clusters*. Os eventos de cada agrupamento foram contabilizados em relação às crises (8 crises) e avaliados em termos de sua preferência: (1) foram filtrados todos os *clusters* com pelo menos 3 evento; (2) os valores de contagem dos eventos por crise foram submetidos à um teste de Chi-Quadrado para ponderar a uniformidade da distribuição; (3) para aqueles não uniformemente distribuídos ($p < 0,05$), a crise de maior porcentagem de eventos foi testada com Qui-Quadrado em relação às demais; (4) por fim, foi atribuída ao agrupamento de eventos a

preferência de ocorrência nos casos novamente não uniformemente distribuídos ($p < 0,05$).

Para cada tetraedro, foi calculada a tendência de crescimento da proporção de *clusters* com preferência por crises (CPCs) utilizando a mesma regressão linear explicada anteriormente, conforme apresentado pela Figura 21A. Note que, apesar de metodologicamente semelhantes, as análises praticadas pelos modelos de regressão linear respondem aspectos diferentes: (1) o crescimento do número de eventos e *clusters*; (2) se CPJC tendem a ocorrer mais com a progressão do *status epilepticus*; e (3) se *clusters* tendem a ser mais específicos em relação às crises (CPCs) durante a progressão do *status epilepticus*. De maneira análoga ao feito anteriormente, os dados de VEEG e iEEG foram comparados diretamente quanto ao total de *clusters* e ao número de *clusters* com especificidade em determinada crise, novamente, a normalidade foi testada com o teste Shapiro-Wilk e, a depender do resultado, testes T pareado ou Wilcoxon foram usados seguidos de correção FDR-BH, conforme mostrado na Figura 21B.

4. RESULTADOS

4.1. Protocolo 1

A Figura 11A apresenta o ERP médio registrado nos animais 10 e 09 do Protocolo 1, respectivamente. Em ambos os painéis, pode-se observar o primeiro ponto de inflexão de cada canal, em cinza, e o primeiro pico positivo, em preto. Além disso, também estão indicados por setas os ruídos causados pela estimulação. É interessante notar que a polaridade da estimulação foi invertida entre os dois animais, entretanto o perfil de ERP permaneceu inalterado, corroborando com o pressuposto de que o registro capturou um potencial evocado e não a propagação de um ruído após a estimulação.

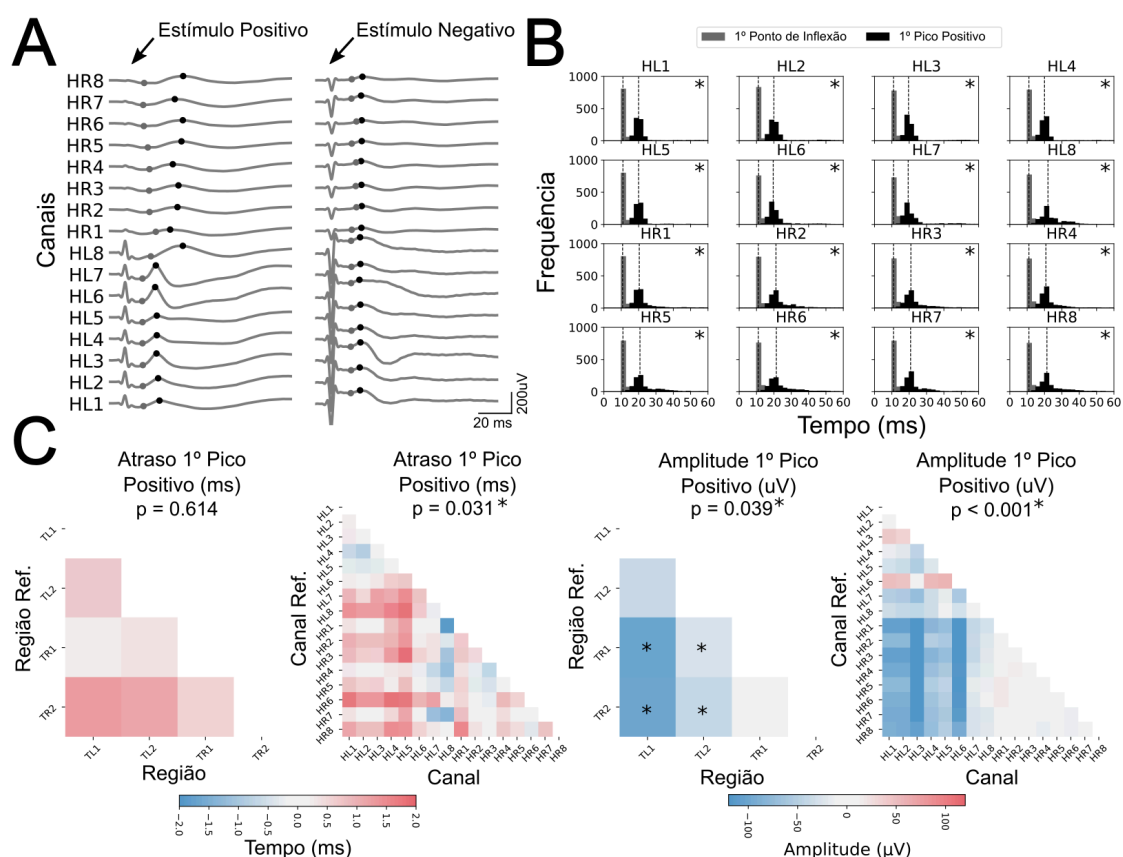


Figura 11 - Potencial evocado relacionado à estimulação elétrica da amígdala basolateral no período basal (antes da administração de PTZ).

(A) ERP médio dos animais 10 e 9, respectivamente. Pontos cinzas indicam a média do primeiro ponto de inflexão, pontos pretos, a média dos primeiros picos positivos e as setas, o ruído médio de estimulação. (B) Histograma de todos os primeiros pontos de inflexão e picos, registrados em cada canal. (C) Relação do atraso do primeiro pico positivo e da amplitude correspondente entre canais ou regiões.

entre conjuntos de VEEG. As cores indicam a mediana da diferença entre pares de elementos, sendo azul uma diferença mediana negativa e vermelho, o inverso.

Para suportar esta hipótese, a Figura 11B apresenta a diferença de variabilidade entre as distribuições dos atrasos dos primeiros pontos de inflexão e dos atrasos dos primeiros picos positivos, ambos em relação à estimulação. Os asteriscos, em cada um dos painéis, representam a diferença entre o desvio padrão dos dois parâmetros ($p < 0,05$ Wilcoxon corrigido por FDR-BH, resultados detalhados no Anexo I Tabela A1), mostrando que os atrasos relacionados aos primeiros pontos de inflexão são menos variáveis que os atrasos relacionados aos primeiros picos positivos.

Já a Figura 11C mostra tanto para as comparações entre canais, quanto para as comparações entre conjuntos de VEEG (ou tetraedros), como os parâmetros analisados foram percebidos de maneira variável pelos diferentes canais. Inicialmente, mostrou-se que existe um efeito global em relação ao atraso dos primeiros picos positivos para as comparações entre canais ($p = 0,031$ teste de Friedman corrigido por FDR-BH), mas não para aquelas entre tetraedros ($p = 0,614$ teste de Friedman corrigido por FDR-BH). A mesma diferença também foi obtida em relação às amplitudes dos primeiros picos positivos para as comparações entre canais ($p < 0,001$ teste de Friedman corrigido por FDR-BH) e entre conjuntos de VEEG ($p = 0,039$ ANOVA de uma via por FDR-BH).

Entretanto, apesar da estatística global, apenas as amplitudes comparadas por tetraedro apresentaram diferença significativa entre canais do hemisfério esquerdo e direito no teste *post hoc* (TR1-TL1: $p = 0,028$ | TL1-TR2: $p = 0,034$ | TL2-TR1: $p = 0,028$ | TL2-TR2: $p = 0,028$; teste T pareado corrigido por FDR-BH). Esse efeito ocorreu devido a aplicação de múltiplos testes estatísticos, em um conjunto extenso de comparações ($16 \times 15 / 2 = 120$ comparações). Ao retirar a correção, a estatística atinge significância para a maioria dos casos entre canais dos diferentes hemisférios (dado omitido), tanto para as comparações relacionadas ao atraso, quanto para aquelas relacionadas à amplitude. Contudo, é notável, pelas cores do gráfico, que eletrodos à direita, contralaterais à estimulação, tendem a ter um atraso maior e uma amplitude menor em relação aos eletrodos ipsilaterais.

Uma vez mostrada a evidência de atividade neural em resposta à estimulação, concentrou-se no estudo do comportamento do potencial evocado ao longo do processo ictogênico induzido pela administração de PTZ. A Figura 12A apresenta toda a progressão do protocolo organizada pelas janelas de 5 estímulos elétricos em termos dos três parâmetros analisados: dispersão angular das amostras do VEEG, magnitude vetorial do VEEG e potencial instantâneo do iEEG.

No exemplo selecionado, é possível visualizar um evidente aumento da magnitude e da potência instantânea, cerca de 100 janelas antes do início da primeira crise (aproximadamente 200 segundos). Esse aumento até se intensifica momentos antes do evento ictal, mas, após início, a atividade parece se concentrar ao redor do estímulo, principalmente nos segundos que sucedem o mesmo. As observações anteriores não valem integralmente para a dispersão angular, que calcula a consistência das repetidas trajetórias em uma única janela. O aumento experimentado pelos parâmetros de magnitude e potência instantânea somente é acompanhado pela dispersão angular após o início da crise, apesar de a mesma se manter sustentada até o final do experimento.

As verificações feitas para o exemplo da Figura 12A em relação ao período pré-ictal podem ser expandidas para o grupo de animais, conforme mostrado pelas Figuras 11B e 11C. Elas apresentam como os três parâmetros podem ser utilizados como preditores do evento ictal e como podem trazer diferentes informações sobre o processo ictogênico. A Figura 12B mostra que, em média, a magnitude e a potência instantânea ultrapassam o limiar basal de 314 a 452 segundos antes do início da crise, enquanto a dispersão angular somente se diferencia do basal segundos antes da crise, como observado anteriormente. Ainda, mostra que a dispersão angular se difere estatisticamente dos demais parâmetros em poder preditivo em todos os conjuntos de VEEG analisados (TL1: $p < 0,001$ | TL2: $p < 0,001$ | TR1: $p < 0,001$ | TR2: $p < 0,001$; teste ANOVA de medidas repetidas corrigido por FDR-BH, o resumo dos dados e as comparações entre parâmetros estão apresentados no Anexo I, pelas Figura A1A e Tabela A2, respectivamente), mas não entre os tetrodos (Dispersão angular: $p = 0,932$ | Magnitude: $p = 0,932$ | Potência: $p = 0,932$; teste ANOVA de uma via corrigido por FDR-BH).

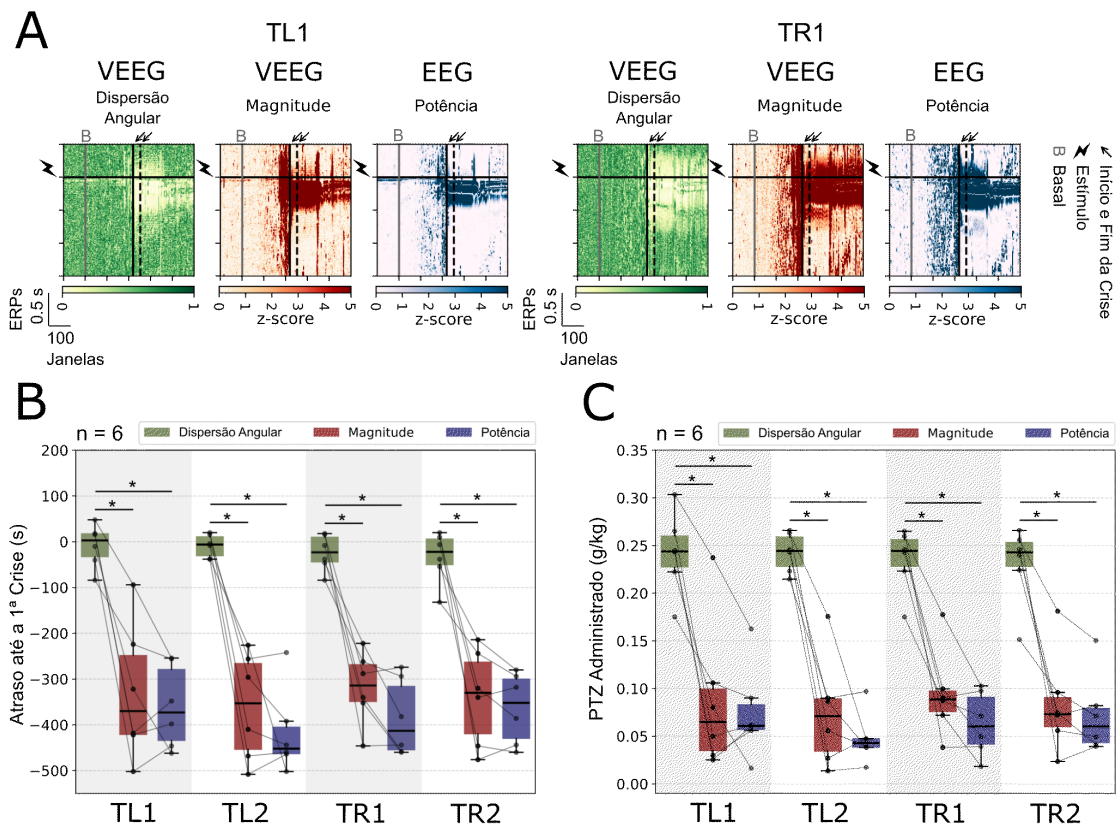


Figura 12 - Progressão do potencial relacionado ao estímulo durante o processo ictogênico.

(A) Etapas do protocolo em termos dos parâmetros analisados. As linhas verticais cinzas, com rótulos “B”, separam o registro basal, as linhas horizontais pretas identificam a ocorrência da estimulação elétrica, as linhas verticais pretas contínuas assinalam o início de uma crise, enquanto as linhas verticais pretas pontilhadas, o final. (B) Momento em que os parâmetros ultrapassam o limiar de atividade nos diferentes conjuntos de VEEG. (C) Quantidades de PTZ administradas por quilograma de animal na qual os parâmetros ultrapassam o limiar de atividade nos diferentes conjuntos de VEEG.

A Figura 12C apresenta os mesmos resultados, mas em termos da quantidade de PTZ administrado normalizado pelo peso do animal. As observações extraídas são as mesmas, tanto para as comparações nos tetrodos (TL1: $p < 0,001$ | TL2: $p < 0,001$ | TR1: $p < 0,001$ | TR2: $p < 0,001$; teste ANOVA de medidas repetidas corrigido por FDR-BH, o resumo dos dados e as comparações entre parâmetros estão apresentados pelas Figura A1B e Tabela A2, respectivamente), quanto para aquelas entre os tetrodos (Dispersão angular: $p = 0,954$ | Magnitude: $p = 0,954$ | Potência: $p = 0,954$; teste ANOVA de uma via corrigido por FDR-BH). Isso indica também uma homogeneidade do protocolo realizado, pois, como o peso dos animais foi

equiparável, a normalização não gerou conclusões distintas daqueles mostrados pela Figura 12B.

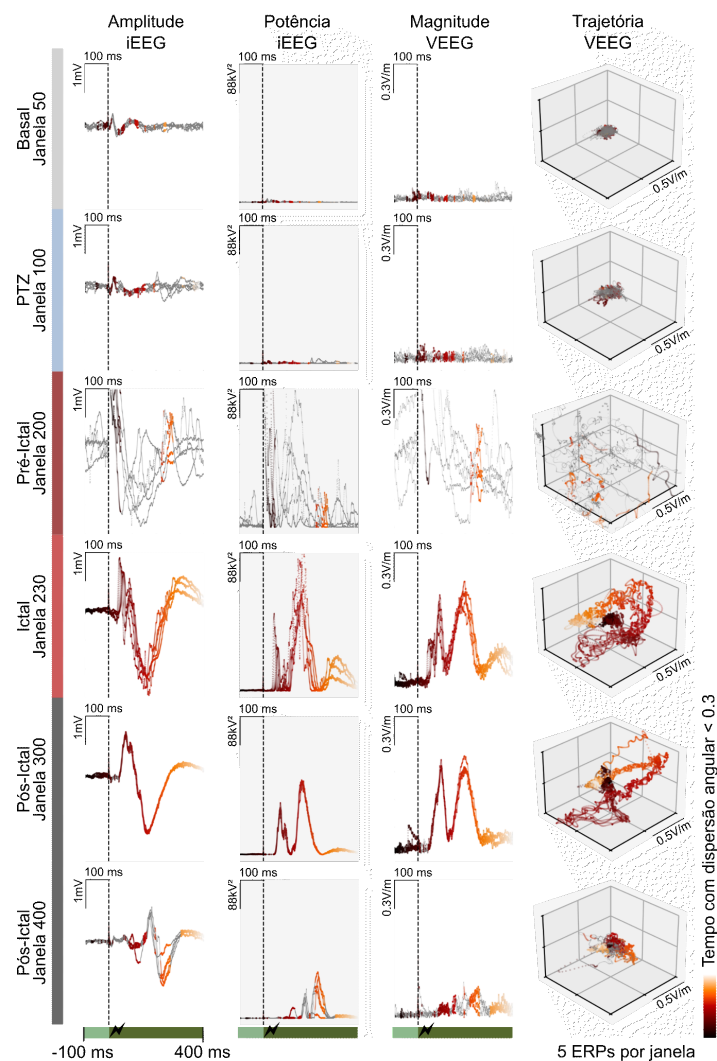


Figura 13 - Evolução do acoplamento neural ao estímulo registrado em diferentes etapas do protocolo. Em cada linha são mostradas janelas contendo 5 ERPs, exatamente como as utilizadas nas análises posteriores. Os tons vermelhos indicam momentos em que a dispersão angular das respostas ao estímulo atingem valores menores que 0,3, enquanto pontos cinza mostram o oposto. Nas colunas estão respectivamente as amplitudes e as potências instantâneas do iEEG, seguidas pelas magnitudes das trajetórias do VEEG e seus padrões tridimensionais. Todos os registros mostrados pertencem ao tetraedro TL1 e ao eletrodo HL2 do animal 03.

Para elucidar um pouco mais da dinâmica do processo, foi necessário abranger a análise para os demais períodos do protocolo. A Figura 13 mostra toda a progressão dos ERPs por meio de janelas estrategicamente selecionadas que exemplificam diferentes fases da ictogênese. É possível notar empiricamente como a amplitude da potência do iEEG e da magnitude

do VEEG crescem após o período de administração de PTZ. Além disso, o último painel mostra como o circuito estimulado se torna mais consistente a partir da janela ictal.

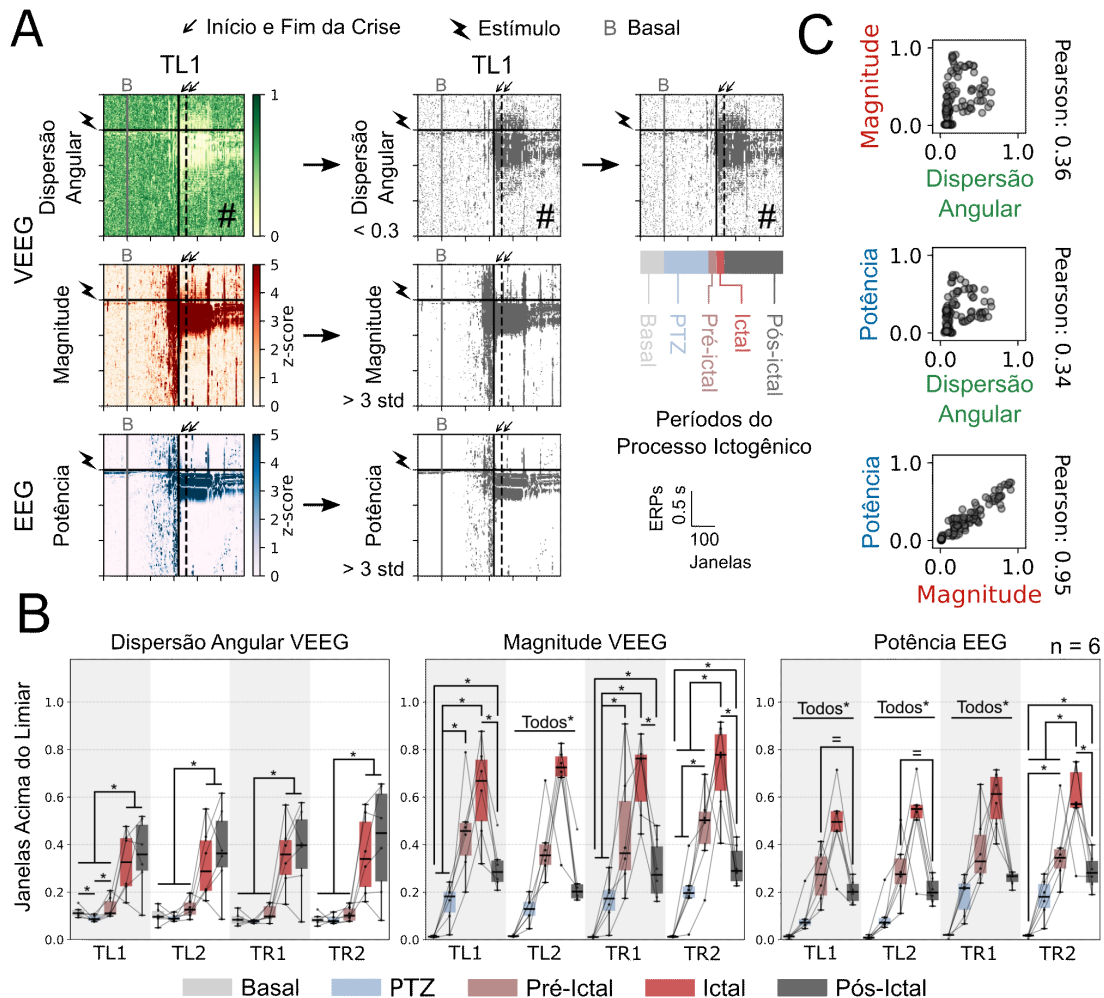


Figura 14 - Análise da dispersão angular dos vetores de VEEG, magnitude vetorial do VEEG e potência instantânea do iEEG para diferentes períodos do protocolo.

(A) Processo de binarização dos dados e separação dos períodos do experimento. A cerquilha (#) indica o exemplo utilizado para a identificação dos períodos. (B) Porcentagem de amostras acima do limiar para os três parâmetros analisados durante os períodos do protocolo. (C) Correlação entre os resultados obtidos por cada parâmetro. Agrupou-se todas as amostras, independente do animal, tetraedro ou período.

A Figura 14A representa a metodologia utilizada para quantificar estes fenômenos, nela está apresentado novamente o conjunto de VEEG TL1 do Animal 06 junto ao processo de binarização descrito na seção de metodologia. Estão também as divisões de cada etapa do protocolo indicadas por cores e rótulos na terceira coluna do gráfico, exemplificadas pelo

diagrama de dispersão angular. A Figura 14C mostra que, independente do animal registrado, conjunto de VEEG (e respectivo canal de iEEG central) ou período do protocolo, a magnitude vetorial e a potência instantânea do iEEG continuam altamente correlacionadas.

A Figura 14B apresenta a progressão dos parâmetros durante o protocolo. Por possuir múltiplas comparações estatísticas (intra e entre grupos de VEEG), seus resultados mais importantes serão resumidos, mas o detalhamento estatístico será apresentado pelo anexo correspondente, indicado ao longo das próximas análises descritivas. A porcentagem de valores de dispersão angular abaixo do limiar permanece inalterada até o início da crise em todos os conjuntos de VEEG, exceto no tetraedro TL1, que apresenta uma breve diminuição em relação ao basal durante a administração do PTZ. Entretanto, uma vez deflagrada a crise eletrográfica, os resultados apontam que as trajetórias passam a apresentar maior repetitividade e, portanto, uma maior porcentagem de dispersão angular abaixo do limiar (análise intra conjunto de VEEG por teste ANOVA de medidas repetidas em TL2, TR1 e TR2 e teste Friedman em TL1, com correção FDR-BH, seguidos de testes *post hoc* Tukey HSD ou Conover; resultados detalhados apresentados pela Figura A2A e pela Tabela A3). Ainda, os tetrodos não se mostraram estatisticamente diferentes para nenhum dos períodos analisados (análise entre conjunto de VEEG por teste ANOVA de uma via no Basal, PTZ, Ictal e Pós-ictal e teste Kruskal-Wallis no Pré-ictal, com correção FDR-BH; resultados detalhados apresentados pela Figura A2A).

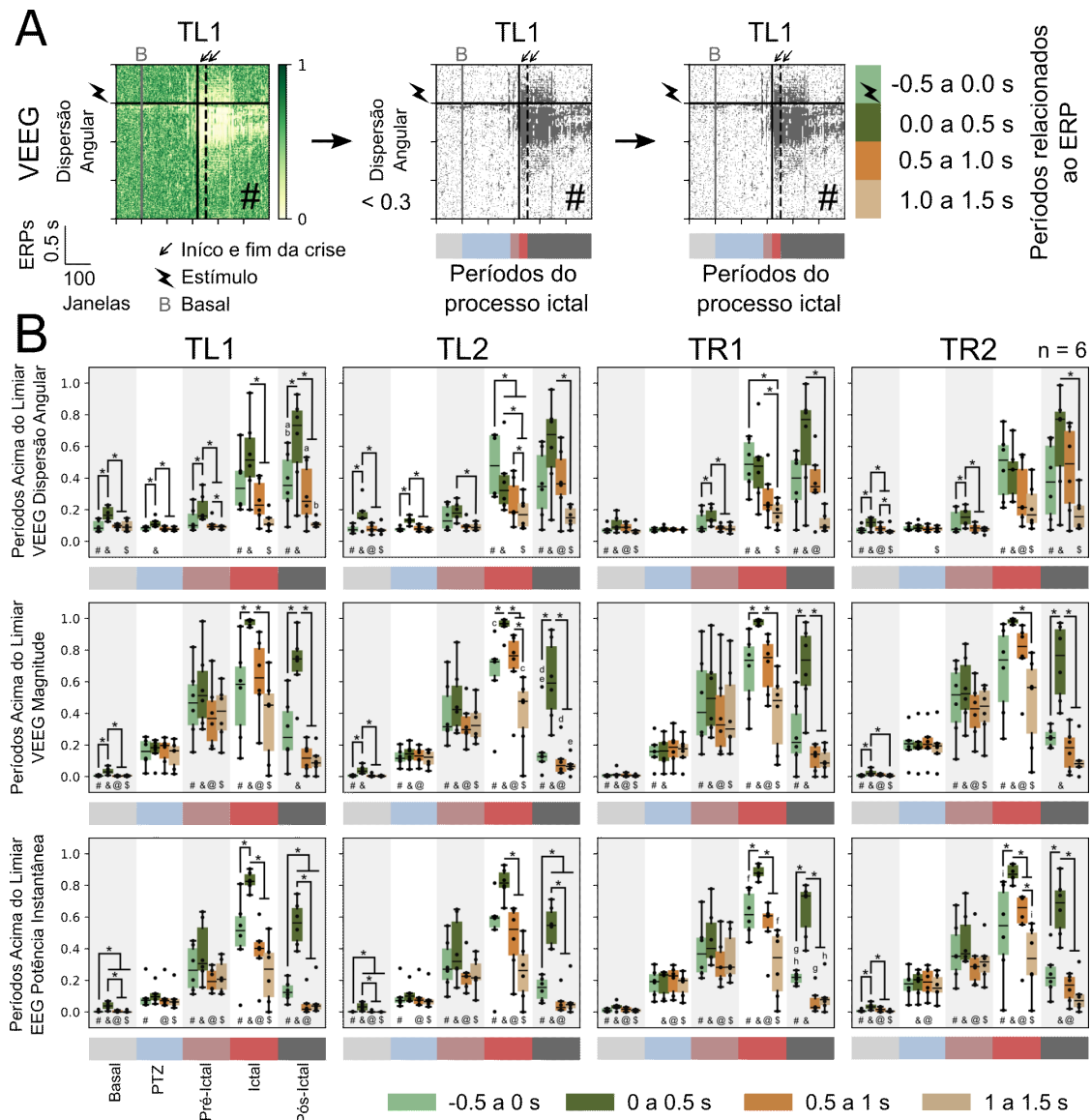


Figura 15 - Análise da dispersão angular dos vetores de VEEG, magnitude vetorial do VEEG e potência instantânea do iEEG para diferentes períodos do protocolo e janelas relacionadas ao ERP.

(A) Processo de binarização dos dados, separação dos períodos do experimento (cores no eixo horizontal) e separação das janelas relacionadas ao ERP (cores no eixo vertical). (B) Porcentagem de amostras acima do limiar para os três parâmetros analisados durante os períodos do protocolo e janelas relacionadas ao ERP.

Em relação à magnitude vetorial (análise intra conjunto de VEEG por teste ANOVA de medidas repetidas em TL1, TR1 e TR2 e teste Friedman em TL2, com correção FDR-BH, seguidos de testes *post hoc* Tukey HSD ou Conover; resultados detalhados apresentados pela Figura A2B e pela Tabela A3) e à potência instantânea do iEEG (análise intra conjunto de VEEG por teste ANOVA de medidas repetidas em TR2 e teste Friedman em TL1, TL2 e TR1 com correção FDR-BH, seguidos de testes *post hoc* Tukey HSD ou

Conover; resultados detalhados apresentados pela Figura A2C e pela Tabela A3), os resultados em geral seguem o mesmo padrão em todos os tetraedros: aumentam progressivamente até o período que compreende a crise eletrográfica e recuam no período pós-ictal, atingindo níveis semelhantes ou menores aos registrados no período pré-ictal. Da mesma forma que para a dispersão angular, em ambos os parâmetros também não houveram diferenças detectadas pelos tetraedros para nenhum dos períodos analisados (análise entre conjunto de VEEG por teste de ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis com correção FDR-BH; resultados detalhados apresentados pela Figura A2B para magnitude, pela Figura A2C para a potência e pela Tabela A3).

Um caminho lógico foi investigar em que momento do ERP a transformação dos parâmetros foi mais relevante. Essa pergunta está também atrelada à observação de que, em alguns casos, o aumento de excitabilidade e, até mesmo a diminuição da dispersão angular, parece preceder o estímulo. A Figura 15A mostra a divisão temporal feita em relação ao ERP, à direita na figura estão as quatro janelas arbitrariamente selecionadas. Note que no eixo horizontal estão também as divisões do protocolo, uma vez que as análises posteriores foram aplicadas seguindo ambas as divisões. Os resultados obtidos estão representados pela Figura 15B, na qual cada linha é um parâmetro e cada coluna, um tetraedro. A partir daqui, para melhor compreensão, as etapas do protocolo (basal, PTZ, pré-ictal, etc.) serão comumente chamadas de períodos, enquanto as etapas relacionadas ao ERP (0 a 0,5 s; 0,5 s a 1; etc.), de janelas.

As análises subsequentes se dividem em três: intra período (ou entre janelas do mesmo período), com estatística identificada nos gráficos pelos asteriscos (testes de ANOVA de medidas repetidas ou Friedman com correção FDR-BH, seguidos de testes *post hoc* Tukey HSD ou Conover; resultados detalhados apresentados pela Tabela A4 e pelas Figuras A3A, A4A e A5A, respectivamente associadas à dispersão angular, magnitude vetorial e potência instantânea do iEEG); entre janelas de diferentes períodos, com estatística identificada pelos símbolos #, &, @ e \$, somente em relação ao basal (testes de ANOVA de medidas repetidas ou Friedman com correção FDR-BH, seguidos de testes *post hoc* Tukey HSD ou Conover; resultados

detalhados apresentados pela Tabela A4 e pelas Figuras A3B, A4B e A5B, respectivamente associadas à dispersão angular, magnitude vetorial e potência instantânea do iEEG); e entre tetraedros, considerando as mesmas janelas e períodos, com estatística ocultada no gráfico (testes de ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis com correção FDR-BH, seguidos de testes *post hoc* Tukey HSD ou Dunn; resultados detalhados apresentados pela Tabela A3 e pelas Figuras A3C, A4C e A5C, respectivamente associadas à dispersão angular, magnitude vetorial e potência instantânea do iEEG).

No que diz respeito à dispersão angular das amostras de VEEG, pode-se perceber que, no período basal (cinza claro, primeiro quadrante) após a estimulação elétrica (verde escuro, segunda barra), a porcentagem de amostras abaixo do limiar é aumentada em relação às demais janelas. Tal observação condiz com o esperado, uma vez que a estimulação da amígdala recrutaria repetidamente a mesma via e, portanto, os mesmos circuitos, elevando a consistência entre as amostras vetoriais dentro de uma janela (resultados estatísticos detalhados apresentados pela Figura A3A).

Entretanto, é de se notar que, apesar da diferença em relação às demais janelas, apenas 20% das amostras ultrapassam o limiar, evidenciando que a diminuição da dispersão angular é aguda. De fato, como mostrado pelas médias de ERPs na Figura 11A e pela dispersão angular diminuída após a estimulação (faixa amarela abaixo da linha de estimulação) nas Figuras 11A e 12A, o efeito do estímulo sobre a rede parece não perdurar por um tempo superior a 100 ms, correspondente à 20% da janela de 500 ms considerada.

A dispersão angular na janela pós-estímulo dos tetraedros TL1 e TL2, permanecem maiores do que as demais após o início da administração de PTZ (azul claro, segundo quadrante). Interessantemente, essa diferença observada é inexistente nos conjuntos de VEEG contralaterais ao estímulo (TR1 e TR2), indicando que a estimulação elétrica perdeu a capacidade de recrutar o mesmo circuito repetidamente como o observado no período basal.

Em seguida, no período pré-ictal (rosa claro, terceiro quadrante), a janela pós-estímulo volta a se diferenciar das demais para a maioria dos tetraedros, se igualando ao período basal. Já no período ictal (rosa escuro, quarto quadrante), é mostrado que tanto a janela pré-estímulo (verde claro,

primeira barra), quanto a pós-estímulo (laranja, terceira barra), ultrapassam as porcentagens registradas no basal (indicado pelo símbolo # e &, respectivamente, e pela Figura A3B). Essa observação aponta que, para além de um maior acoplamento dos circuitos após o estímulo, existiu também uma menor dispersão angular antes da estimulação, o que pode indicar que a via não somente está mais responsiva, ou acoplada ao estímulo, como também existe uma modificação prévia, que compreende aproximadamente 50% das amostras registradas na janela (250 ms).

Para além, os momentos que sucedem a crise (período pós-ictal, em cinza escuro) perpetuam ambas as observações. Janelas pré-estímulos continuam a apresentar valores maiores que o basal, da mesma maneira que as janelas imediatamente após a estimulação. Ainda, em dois dos eletrodos (TL2 e TR1), é observado que as janelas que compreendem 500 ms a 1 s após o estímulo (laranja, terceira barra) possuem valores maiores que o basal (indicado pelo símbolo @ e pelos resultados estatísticos detalhados apresentados pela Figura A3B) e não mais se diferem das janelas que as precedem. Isso indica que, no período pós-ictal, a via em alguns casos está ainda mais acoplada, por permanecer com uma baixa dispersão angular por mais tempo.

Os resultados de magnitude vetorial do VEEG e potência instantânea do iEEG apontam, assim como o discorrido anteriormente, aspectos distintos do processo ictogênico, apesar de possuírem, nesse experimento, grandezas correlacionadas. Dito isso, as descrições que se seguem, compreendem ambos os parâmetros, pois, embora apresentem pequenas variações, obtiveram relações semelhantes nas comparações entre períodos de protocolo e janelas de ERP.

Os módulos dos vetores na janela pós-estímulo do período basal, assim como as potências instantâneas, são, no geral, maiores do que os registrados nas demais janelas (resultados estatísticos detalhados apresentados pela pelas Figura A4A e Figura A5A), em conformidade com o que foi explicado para os resultados de dispersão angular. No período subsequente, existem evidências de um aumento da magnitude vetorial e da potência, observada por algumas diferenças estatísticas em relação ao basal (indicado pelos símbolos #, &, @ e \$, e pelos resultados estatísticos

detalhados apresentados pelas Figura A4B e Figura A5B). Entretanto, é interessante notar que não são mais percebidas diferenças estatísticas entre as janelas do ERP. Isso mostra que, apesar de uma maior atividade neural, ela não está especificamente atrelada somente à estimulação.

No que diz respeito à comparação entre os resultados obtidos pelos diferentes conjuntos de VEEG, não foram verificadas diferenças em nenhum dos parâmetros estudados. Isso se deu apesar das observações citadas em relação ao hemisfério contralateral ao estímulo, que se desviou de alguns padrões apresentados pelo lado ipsilateral (resultados estatísticos detalhados apresentados pela pelas Figura A3C, Figura A4C e Figura A5C).

A Figura 16 apresenta outro aspecto dos dados registrados. Ao contabilizar os eventos e os *clusters* e caracterizá-los temporalmente, foi possível mostrar a variedade dos circuitos participantes do processo ictal, assim como os padrões de organização dos mesmos em cada etapa do protocolo. É importante lembrar que cada trajetória está atrelada a uma ativação sequencial de diversos dipolos elétricos e portanto, eventos identificados no VEEG tendem a capturar aspectos de um circuito particular.

Inicialmente, é possível afirmar que existe uma maior quantidade de eventos no período pré-ictal, do que no pós-ictal, para todos os tetraedros, como mostrado pela Figura 16A (TL1 pré-ictal 198 [170 - 205]; pós-ictal 89 [80 - 94]; $p = 0,031$ | TL2 pré-ictal 176 [172 - 184] pós-ictal 90 [73 - 94]; $p = 0,021$ | TR1 pré-ictal 188 [175 - 196] pós-ictal 93 [89 - 93]; $p = 0,031$ | TR2 pré-ictal 179 [171 - 193] pós-ictal 90 [81 - 94]; $p = 0,021$; teste Wilcoxon unilateral corrigido por FDR-BH), na qual cada círculo preto representa um animal. Além disso, também existe uma maior prevalência de eventos não agrupados no período pré-ictal, conforme mostrado pelos círculos vermelhos (TL1 pré-ictal 42 [33 - 50]; pós-ictal 5 [4 - 12]; $p = 0,041$ | TL2 pré-ictal 30 [22 - 37] pós-ictal 6 [6 - 10]; $p = 0,031$ | TR1 pré-ictal 28 [17 - 66] pós-ictal 6 [3 - 16]; $p = 0,109$ | TR2 pré-ictal 29 [24 - 34] pós-ictal 8 [2 - 24]; $p = 0,031$; teste Wilcoxon unilateral corrigido por FDR-BH).

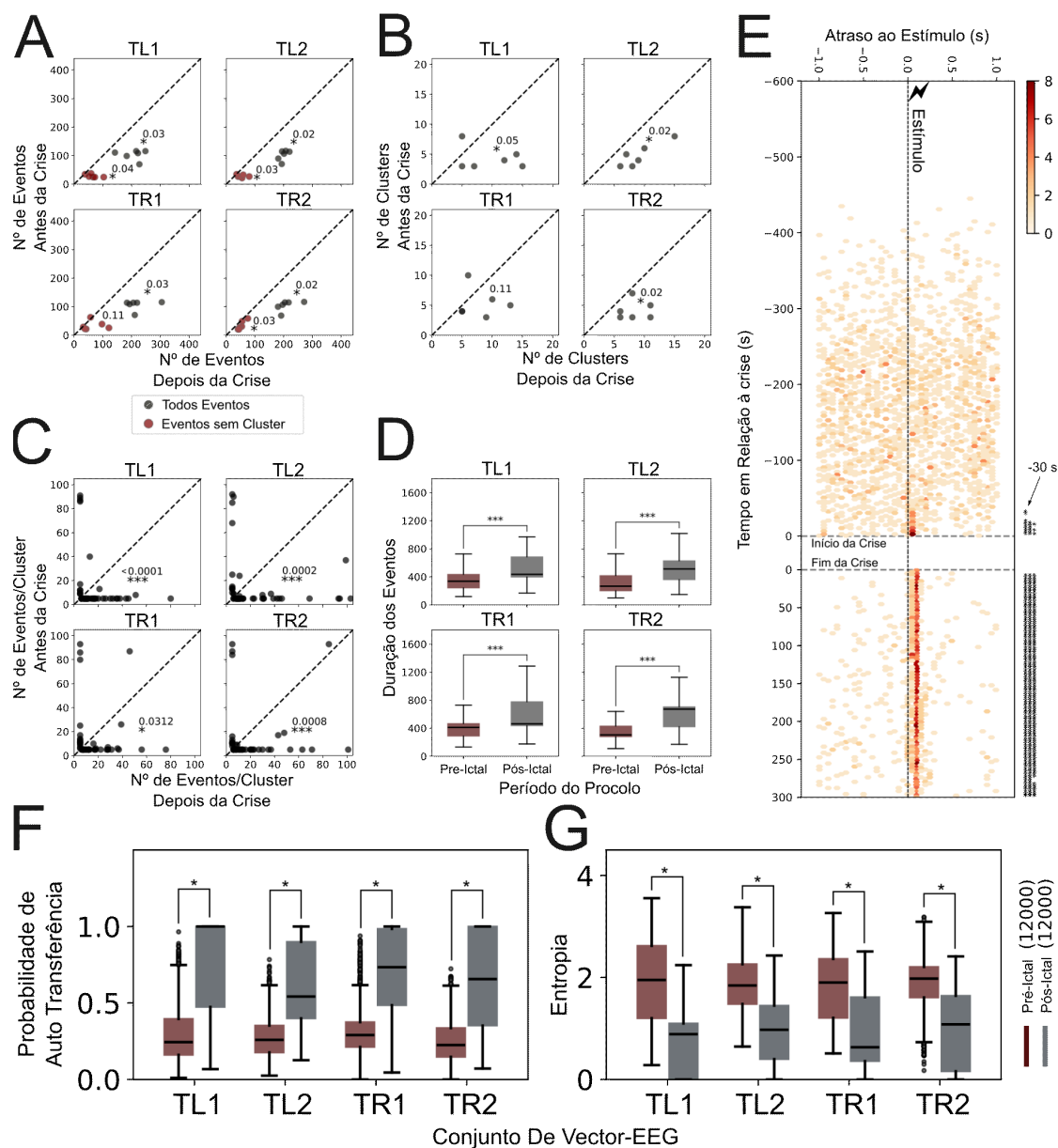


Figura 16 - Caracterização dos eventos de VEEG e dos *clusters* de trajetórias identificados.

(A) Quantidade de eventos identificados separados entre os períodos pré e pós-ictal. Círculos pretos representam todos os clusters de cada animal que foram identificados nos hemisférios direito ou esquerdo, respectivamente. Círculos vermelhos são os eventos não associados à nenhum cluster. (B) Número de *clusters* por animal, separados entre os períodos pré e pós-ictal. (C) Número de eventos por cluster, separados entre os períodos pré e pós-ictal. (D) Distribuição da duração dos eventos identificados nos períodos pré e pós ictal. (E) Todos os eventos identificados dispostos em relação à estimulação mais próxima. A quantidade de eventos está representada por um histograma hexagonal bidimensional, cuja cor detalha o número de eventos por área. Asteriscos à direita indicam janelas em que $p < 0.05$ para o teste de uniformidade de Rayleigh. (F) Resultados da reamostragem *bootstrap* das sequências de clusters, comparando os períodos pré-ictal e pós-ictal. Média da diagonal principal da matriz de transição entre *clusters*, representando a persistência em cada estado. (G) Mesmo que o painel F. Entropia das sequências de *clusters*, refletindo a variabilidade e complexidade do padrão de ativação neural.

A Figura 16B apresenta que a maior quantidade de circuitos também refletiu em uma maior quantidade de *clusters* identificados no período pré-ictal, exceto para o tetraedro TR1 (TL1 pré-ictal 8 [4 - 12]; pós-ictal 2 [2 - 4]; $p = 0,047$ | TL2 pré-ictal 8 [6 - 9] pós-ictal 4 [2 - 5]; $p = 0,015$ | TR1 pré-ictal 6 [4 - 9] pós-ictal 4 [3 - 5]; $p = 0,109$ | TR2 pré-ictal 7 [6 - 9] pós-ictal 2 [2 - 4]; $p = 0,015$; teste Wilcoxon unilateral corrigido por FDR-BH). Já a Figura 16C mostra como é a distribuição dos eventos por *cluster*, a concentração de círculos próxima ao eixo horizontal indica que aqueles *clusters* que ocorreram antes da crise, não voltaram a se repetir após a crise (TL1 pré-ictal/total: 1.00 [0.98 - 1.00]; $p < 0,001$ | TL2 pré-ictal/total: 1.00 [0.62 - 1.00]; $p < 0,001$ | TR1 1.00 [0.00 - 1.00]; $p = 0,031$ | TR2 1.00 [0.49 - 1.00]; $p < 0,001$; teste Wilcoxon unilateral corrigido por FDR-BH). De maneira inversa, a concentração de círculos próxima ao eixo vertical, aponta que aqueles *clusters* que ocorreram depois da crise, possuem baixa probabilidade de já terem ocorrido antes da crise.

Outro aspecto mencionado anteriormente foi em relação à duração dos eventos. A Figura 16D explicita que os eventos identificados depois da crise são mais duradouros do que aqueles que ocorreram antes da crise. Isso indica um maior recrutamento de circuitos, uma vez que quanto mais vias são integradas, maior o tempo para que a informação seja transmitida (TL1 pré-ictal 337 [242 - 436] pós-ictal 436 [397 - 686]; $p < 0,001$ | TL2 pré-ictal 267 [200 - 418] pós-ictal 513 [359 - 630]; $p < 0,001$ | TR1 pré-ictal 412 [288 - 468] pós-ictal 463 [436 - 779]; $p < 0,001$ | TR2 pré-ictal 306 [279 - 432] pós-ictal 673 [420 - 707]; $p < 0,001$; teste de Mann-Whitney corrigido por FDR-BH).

A Figura 16E mostra a organização de todos os picos de magnitude dos eventos registrados em relação à estimulação. Nela, está o exemplo do conjunto de VEEG TL1, com as janelas não uniformes identificadas pelo asterisco à direita do gráfico. Pode-se observar que, aproximadamente 30 segundos antes do início da crise conforme mostrado pela seta preta ($p < 0,05$ teste de uniformidade circular de Rayleigh sem correção por FDR-BH), os eventos deixam de acontecer de maneira aleatória (distribuição uniforme) e passam a suceder a estimulação elétrica.

No período pós-ictal, além da diminuição no número de eventos, é evidente que estes estão totalmente relacionados ao estímulo e, portanto, não

possuem distribuição uniforme em nenhuma das janelas de análise. Os resultados dos demais tetraedros estão ocultados por possuírem comportamento semelhante e o fenômeno de sincronização dos eventos ao estímulo pode ser detectado em -37,8, -30,19 e -20 segundos antes da crise, respectivamente para os tetraedros TL2, TR1 e TR2 ($p < 0,05$ teste de uniformidade circular de Rayleigh sem correção por FDR-BH).

Apesar de apresentar aspectos sobre a diversidade dos circuitos envolvidos, os dados mostrados até aqui não abrangem a forma pela qual os padrões evoluem e se relacionam. Isso somente pode ser analisado através da Figuras 16F e 16G, que expõem como os *clusters* no pós-ictal tem, no geral, maior probabilidade de dominar uma sequência de eventos (TL1 pré-ictal 0.93 [0.58 - 1.00] pós-ictal 0.23 [0.21 - 0.42]; $p = 0,029$ | TL2 pré-ictal 0.55 [0.42 - 0.79] pós-ictal 0.26 [0.20 - 0.32]; $p = 0,023$ | TR1 pré-ictal 0.75 [0.60 - 0.89] pós-ictal 0.30 [0.24 - 0.34]; $p = 0,020$ | TR2 pré-ictal 0.69 [0.43 - 0.86] pós-ictal 0.22 [0.16 - 0.33]; $p = 0,020$; teste T pareado corrigido por FDR-BH), além de possuir uma menor entropia (TL1 pré-ictal 0.82 [0.16 - 1.01] pós-ictal 1.95 [1.28 - 2.50]; $p = 0,039$ | TL2 pré-ictal 0.95 [0.53 - 1.41] pós-ictal 1.87 [1.51 - 2.15]; $p = 0,010$ | TR1 pré-ictal 0.71 [0.41 - 1.45] pós-ictal 2.01 [1.35 - 2.31]; $p = 0,034$ | TR2 pré-ictal 1.08 [0.31 - 1.69] pós-ictal 2.02 [1.69 - 2.12]; $p = 0,010$; teste T pareado corrigido por FDR-BH). Em outras palavras, uma sequência de eventos no período pós-ictal tende a pertencer predominantemente a um ou poucos *clusters*, além disso, é maior a probabilidade de um evento do *cluster* suceder um outro evento do mesmo *cluster*.

4.2. Protocolo 2

A Figura 17 abaixo mostra a qualidade da identificação de eventos e rotulagem de *clusters* feitas pelo algoritmo para as análises do Protocolo 2, usando como exemplo alguns grupos de eventos registrados pelo conjunto de VEEG do hipocampo esquerdo do animal 010. Mesmo de forma automática, os eventos, mostrados em preto na Figura 17A, parecem de fato pertencerem a um mesmo grupo de trajetórias, que são apresentadas tridimensionalmente pela Figura 17B e em termos de suas magnitudes na Figura 17C. É

importante notar que cada linha do conjunto de gráficos da Figura 17 representa um *cluster*, que foi selecionado de forma a explicitar eventos com preferência de ocorrência em determinada faixa do experimento (das crises iniciais até as crises finais). A rotina foi capaz de detectar uma variedade interessante de padrões, independente de amplitude ou duração (Figura 17C) e o mesmo se aplica aos dados de iEEG, apesar de não estarem mostrados.

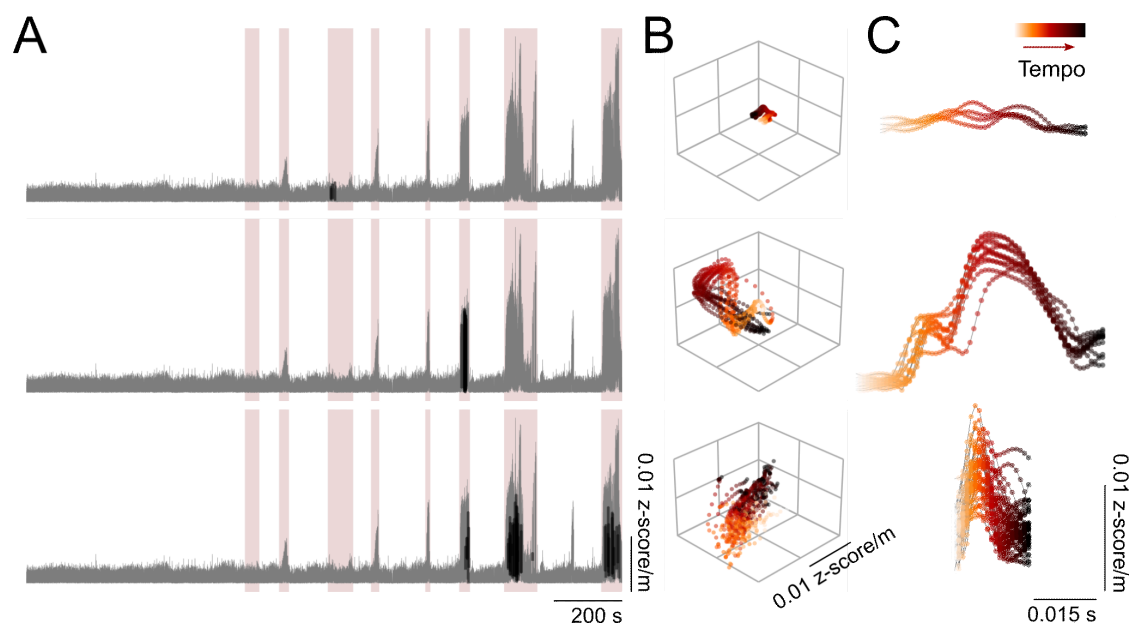


Figura 17 - Exemplo do processo de identificação de eventos e agrupamento de padrões.

(A) Magnitude vetorial do VEEG registrado no hipocampo esquerdo do animal 010. Em vermelho estão delineadas as crises e, em preto, alguns eventos identificados pelo algoritmo e classificados como semelhantes. Cada linha apresenta um *cluster* referente a uma etapa distinta do protocolo. (B) Trajetória vetorial dos eventos mostrados no painel A, a fim de apresentar a consistência dos padrões agrupados. (C) Magnitude das trajetórias dos eventos aproximada. Note que o eixo horizontal não é padronizado.

A Figura 18 abaixo representa um outro aspecto da rotina de análise. Aqueles *clusters* que foram identificados puderam ser separados em termos de sua preferência de atividade, seja relacionada ao momento de cada crise (início, meio e fim) como mostrado na Figura 18A, seja pela crise específica (crise 1, 5, 7) como mostrado na Figura 18B. Ambos os gráficos apresentam *clusters* do conjunto de VEEG da amígdala esquerda do Animal 004, coloridos em laranja, vermelho e cinza estão os CPJC que atuam preferencialmente no início, meio e fim das crises, respectivamente. Em especial para a Figura 18B, para fins demonstrativos, foram evidenciados aqueles *clusters* com dupla preferência (por partição e por crise), ou seja, da Figura 18A filtraram-se

aqueles que se relacionam também a uma crise específica. Vale lembrar que os resultados aqui mostrados foram estatisticamente delineados ($p < 0,05$ no teste Chi-Quadrado para cada distribuição de ocorrência e $p < 0,05$ nos testes Chi-Quadrado partição por partição, com posterior correção FDR-BH) para cada um dos tipos de preferência (momento ou crise) separadamente.

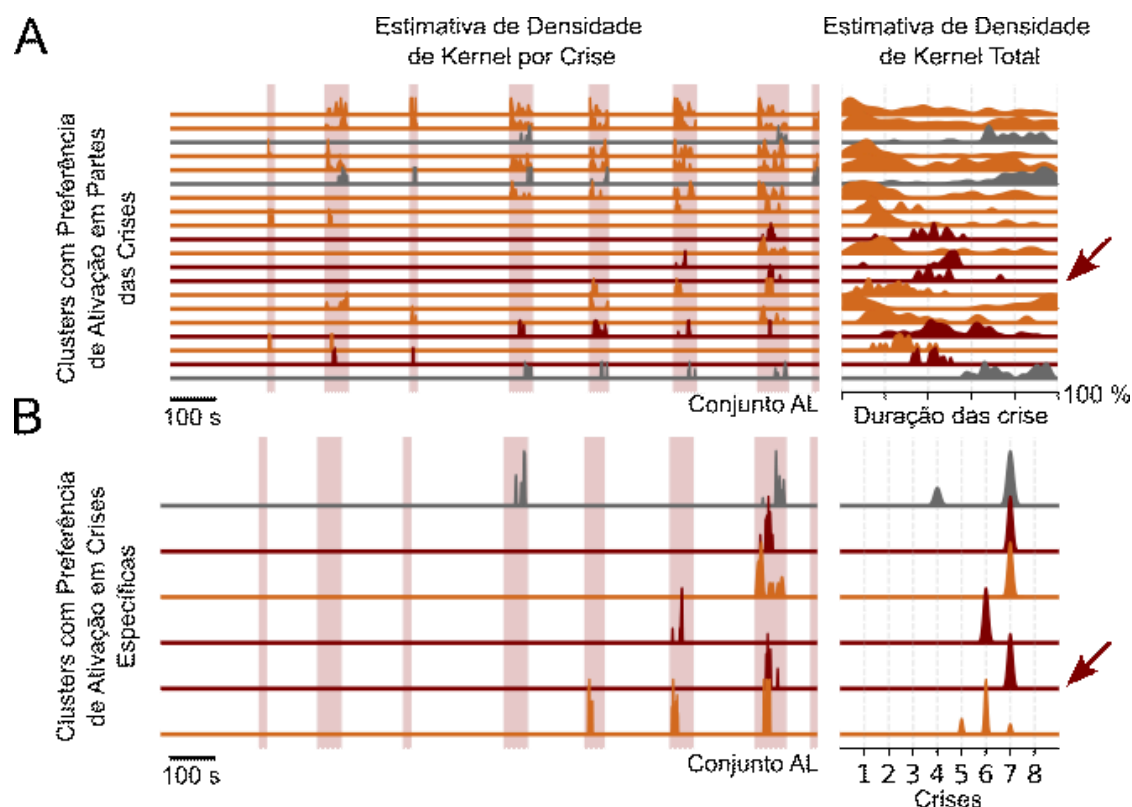


Figura 18 - Exemplo do processo de classificação de *clusters*.

(A) *Clusters* com preferência de atividade em partes da crise, sendo as cores laranja, vermelho e cinza representantes da preferência pelo início, meio e fim das crises, respectivamente. O painel à esquerda mostra a estimativa de densidade de eventos em cada crise, enquanto o painel à direita mostra a expectativa geral de cada grupo de eventos, que foi obtida pela normalização do período de crise em porcentagem. (B) Da mesma forma que o painel A, entretanto, os *clusters* mostrados são aqueles específicos para uma única crise. Estão apresentados apenas aqueles grupos de eventos pertencentes à interseção entre as classificações por momento da crise e por crise. Os retângulos vermelhos representam as crises e as setas indicam um mesmo *cluster*. As setas vermelhas mostram um mesmo *cluster*, positivo para ambas as classificações.

Por meio das identificações e classificações realizadas com VEEG, o número de eventos e o número de *clusters* aumentaram de maneira proporcional à evolução das crises de maneira significativa em todos os tetraedros, exceto em relação ao número de *clusters* no hipocampo direito,

conforme mostrado na Figura 19A ($p < 0,05$ teste T relacionado à regressão linear com correção FDR-BH; resultados detalhados no Anexo I Tabela A5). As mesmas observações não foram encontradas nos resultados obtidos por meio dos registros de iEEG, apresentados na Figura 19B, no quais apenas eletrodos ipsilaterais à administração do KA exibiram um aumento progressivo no número de eventos ($p < 0,05$ teste T relacionado à regressão linear com correção FDR-BH; resultados detalhados no Anexo I Tabela A6). Apesar dessa observação, o crescimento não se refletiu em um aumento no número de *clusters*.

As Figuras 19C e 19D, por outro lado, mostram respectivamente que a proporção de eventos em CPJC e dos próprios CPJP se mantiveram constante durante todo o experimento naquelas classificações realizadas por VEEG ($p > 0,05$ teste T relacionado à regressão linear com correção FDR-BH; resultados detalhados no Anexo I Tabela A7). Os resultados obtidos por meio de registros de iEEG mostram não somente a constância dessa proporção, mas também uma diminuição no número de *clusters* rotulados em ambos os hipocampus ($p > 0,05$ teste T relacionado à regressão linear com correção FDR-BH; resultados detalhados no Anexo I Tabela A8).

A partir das sucessivas classificações aplicadas aos eventos de trajetória de VEEG e de potência de iEEG, foram estudados os padrões de preferência de atividade obtidos para cada região de registro. Em nenhuma das regiões registradas foi possível contabilizar proporções estatisticamente diferentes entre os CPJC (VEEG AL $p = 0,181$ | HR $p = 0,181$; HL $p = 0,491$ | AR $p = 0,623$; EEG AL $p = 0,078$ | HL $p = 0,079$ | AR $p = 0,082$ | HR $p = 0,078$; teste Friedman, ambos corrigidos por FDR-BH, demais valores no Anexo I Tabela A9).

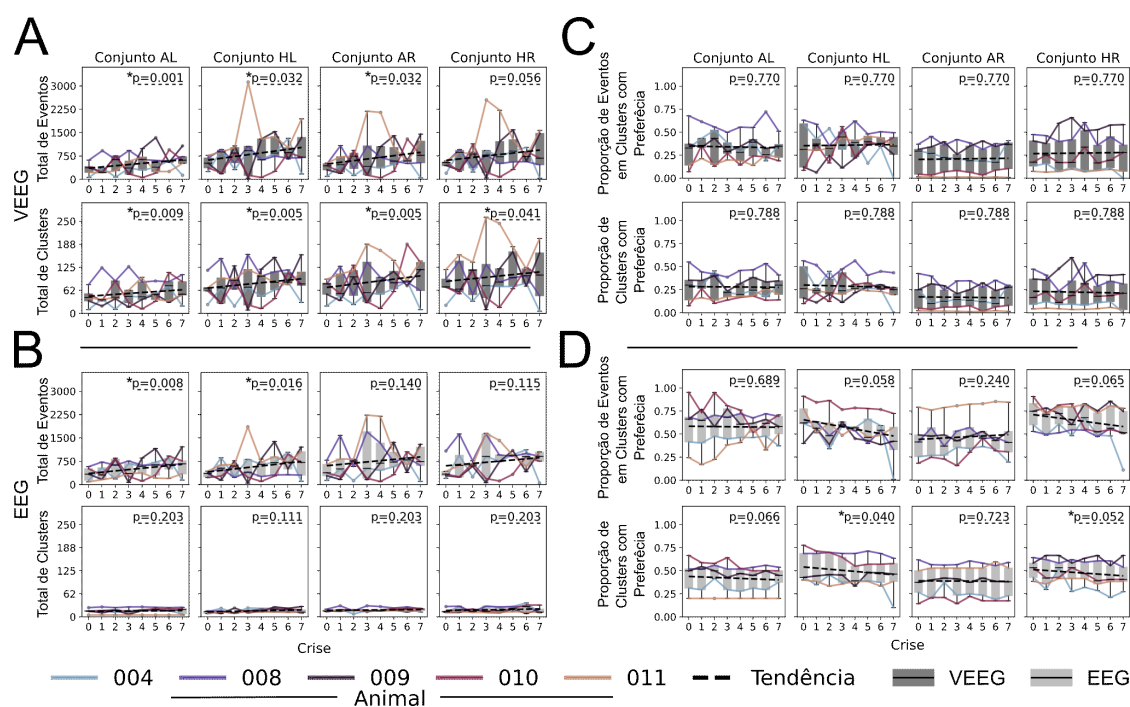


Figura 19 - Progressão do número de eventos, número de *clusters* e proporção de cluster com preferência de atividade em janelas da crise.

(A) Progressão do número de eventos e *clusters* identificados por VEEG para cada tetraedro durante as sucessivas crises registradas. (B) Progressão do número de eventos e *clusters* identificados por iEEG para cada tetraedro durante as sucessivas crises registradas. (C) Progressão da proporção de eventos e *clusters* com preferência de atividade em janelas da crise identificados por VEEG para cada tetraedro durante as sucessivas crises registradas. (D) Progressão da proporção de eventos e *clusters* com preferência de atividade em janelas da crise identificados por iEEG para cada tetraedro durante as sucessivas crises registradas.

Em relação à região cerebral com maior probabilidade de ocorrência de *clusters*, relacionados a cada momento das crises, um efeito de grupo (VEEG 1ª Parte $p = 0,002$ | 2ª Parte $p = 0,935$; teste ANOVA de medidas repetidas e 3ª Parte $p = 0,606$; teste Friedman, ambos corrigidos por FDR-BH) foi encontrado para o primeiro terço das crises naquelas classificações realizadas por VEEG. A avaliação *post hoc* evidenciou diferenças entre as amígdalas sendo aquela ipsilateral à administração do KA mais especializada (VEEG 1ª parte AL 0,400 [0,304 - 0,565] | HL 0,417 [0,416 - 0,471] AR 0,214 [0,153 - 0,400] HR 0,304 [0,258 - 0,457]; AL- HL $p = 0,3136$ | AL - HR $p = 0,153$ | AL - AR $p = 0,007$; teste T pareado, demais valores no Anexo I Tabela A10). Por outro lado, nenhum efeito (EEG 1ª Parte $p = 0,924$ | 2ª Parte $p = 0,924$ | 3ª Parte sem eventos identificados; teste Friedman corrigido por

FDR-BH) foi observado para aquelas classificações realizadas por iEEG, conforme mostrado pela Figura 20B.

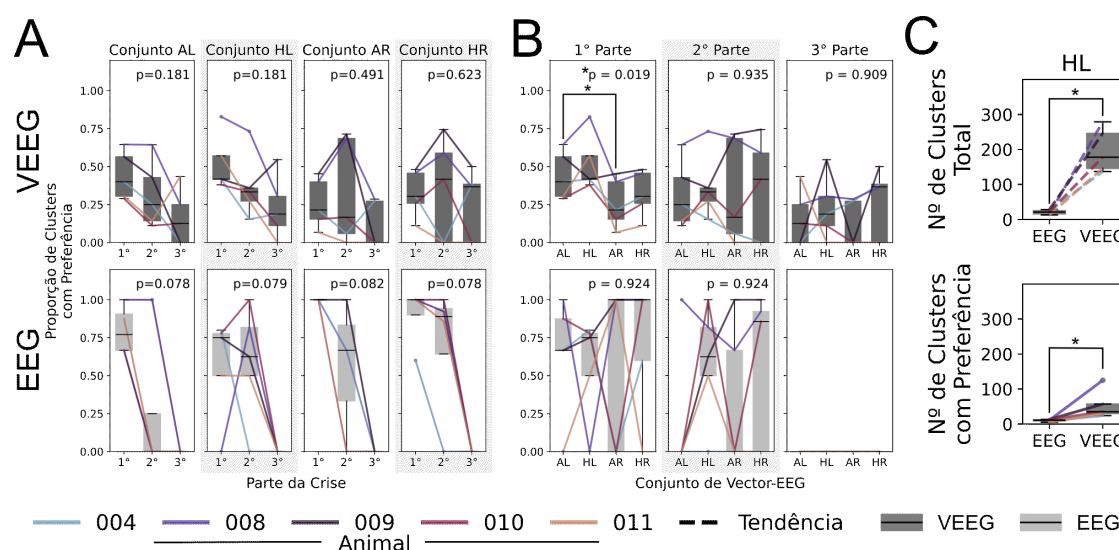


Figura 20 - Clusters com preferência de atividade em períodos específicos referentes à dinâmica de cada crise.

A classificação proposta é relacionada a cada um dos três terços da duração das crises, nomeados aqui 1ª, 2ª e 3ª parte. (A) Proporção de *clusters* com preferência de atividade, analisados em relação à parte preferencial para cada conjunto de VEEG, na parte superior, ou eletrodo de iEEG, na parte inferior. (B) Proporção de *clusters* com preferência de atividade, analisados em relação à região registrada para cada período preferencial. Na parte superior estão os *clusters* identificados pelas trajetórias de VEEG e na parte inferior, aqueles identificados pelas potências de iEEG. (C) Progressão da proporção de *clusters* com preferência de atividade analisados em relação às ocorrências por crise, sendo cada região registrada representada por uma coluna. Novamente, a parte superior se refere aos dados do VEEG e a parte inferior, aos dados de iEEG. (D) Comparação entre o número total de *clusters* e entre o número de *clusters* com preferência de atividade identificados por meio dos dados de iEEG e VEEG.

A Figura 20C mostra, com o exemplo do hipocampo esquerdo, a diferença no número total de *clusters* identificados entre VEEG e iEEG, assim como no número de *clusters* com preferência de atividade em momentos específicos das crises. As demais regiões de registro foram omitidas, mas em todas as comparações, o VEEG foi capaz de identificar uma maior diversidade de circuitos ou padrões eletrográficos em relação ao iEEG (Total AL EEG 20.0 [17.0 - 22.0] VEEG 131.0 [119.0 - 171.0]; $p = 0.006$ | Total HL EEG 21.0 [16.0 - 25.0] VEEG 178.0 [146.0 - 246.0]; $p = 0.003$ | Total AR EEG 19.0 [15.0 - 22.0] VEEG 204.0 [140.0 - 214.0]; $p = 0.002$ | Total HR EEG 29.0 [21.0 - 32.0] VEEG 240.0 [188.0 - 273.0]; $p = 0.004$ | Preferência AL EEG 9.0

[5.0 - 11.0] VEEG 20.0 [20.0 - 21.0]; $p = 0.042$ | Preferência HL EEG 11.0 [9.0 - 12.0] VEEG 35.0 [30.0 - 57.0]; $p = 0.042$ | Preferência AR EEG 8.0 [4.0 - 9.0] VEEG 14.0 [10.0 - 32.0]; $p = 0.073$ | Preferência HR EEG 13.0 [8.0 - 14.0] VEEG 26.0 [13.0 - 86.0]; $p = 0.042$; teste T pareado ou Wilcoxon com correção FDR-BH).

Em resumo, os resultados apontam para a maior capacidade do VEEG em identificar padrões eletrográficos e, indiretamente, circuitos envolvidos durante sucessivos eventos ictais. Considerando que aqueles *clusters* igualmente capazes de atuar em qualquer fase da crise tem menor relevância para o processo ictal, seja na deflagração, manutenção ou extinção da crise, três principais características das regiões registradas foram reveladas: (1) a amígdala esquerda, ipsilateral à administração do KA, parece possuir mais circuitos específicos do que a amígdala contralateral, apesar de não apresentar uma maior proporção de *clusters* em um momento específico da crise; (2) o processo ictogênico parece ganhar em complexidade, com um aumento do número de eventos e *clusters* identificados. Esse efeito foi mostrado, no geral, para todas as regiões registradas e somente é percebido pelas trajetórias de VEEG, interessante, apesar do aumento de *clusters* a proporção de CPJC é constante nas sucessivas crises estudadas.

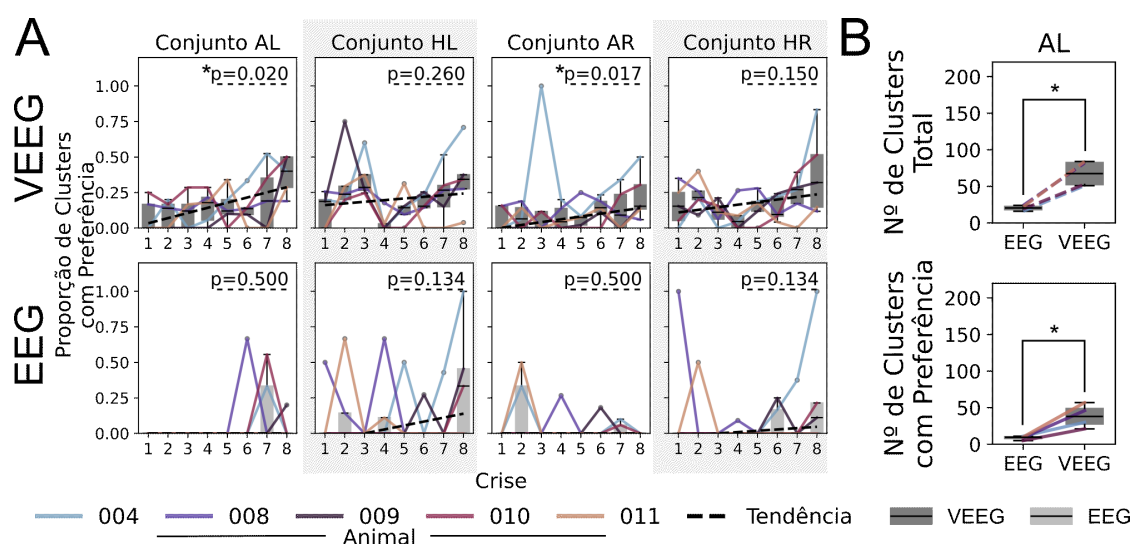


Figura 21 - *Clusters* com preferência de atividade em crises específicas. A classificação proposta é relacionada a cada uma das oito crises estudadas, numeradas aqui de 1 a 8.

(A) Proporção de *clusters* com preferência por cada crise, analisados em cada região de registro. Da mesma forma que na figura anterior, a parte superior se refere aos dados do VEEG e a parte inferior, aos dados de iEEG. (B) Comparação entre o número total de *clusters* e entre o número de *clusters* com

preferência de atividade em crises específicas identificados por meio dos dados de iEEG e VEEG. (C) Proporção de *clusters* com preferência dupla: por crise e por terço dentro das crises, analisados em cada região de registro. A parte superior se refere aos dados do VEEG e a parte inferior, aos dados de iEEG.

Quanto à especificidade de CPCs, foi encontrada uma tendência de crescimento linear diferente de 0 apenas nas amígdalas (VEEG AL taxa 0,036 $p = 0,020$ | HL taxa 0,011 $p = 0,260$ | AR taxa 0,020 $p = 0,017$ | HR taxa 0,018 $p = 0,150$; teste T relacionado à regressão linear com correção FDR-BH). Em contrapartida, para os dados de iEEG, nenhum dos eletrodos foi capaz de apresentar efeitos significativos (EEG AL taxa 0 $p = 0,500$ | HL taxa 0,028 $p = 0,134$ | AR taxa 0 $p = 0,500$ | HR taxa 0,009 $p = 0,134$; teste T relacionado à regressão linear com correção FDR-BH), conforme mostrado na Figura 21A.

A Figura 21B, com o exemplo da amígdala esquerda, apresenta a diferença no número de CPCs identificados entre VEEG e iEEG. As demais regiões de registro foram omitidas, mas em todas as comparações, o VEEG foi capaz de identificar uma maior diversidade de circuitos ou padrões eletrográficos em relação ao EEG (Total AL EEG 19.0 [16.0 - 22.0] VEEG 131.0 [122.0 - 173.0]; $p = 0.006$ | Total HL EEG 19.0 [14.0 - 23.0] VEEG 179.0 [147.0 - 249.0]; $p = 0.003$ | Total AR EEG 19.0 [17.0 - 22.0] VEEG 211.0 [141.0 - 215.0]; $p = 0.002$ | Total HR EEG 27.0 [21.0 - 28.0] VEEG 242.0 [189.0 - 278.0]; $p = 0.003$ | Preferência AL EEG 4.0 [4.0 - 5.0] VEEG 38.0 [31.0 - 44.0]; $p = 0.005$ | Preferência HL EEG 7.0 [7.0 - 10.0] VEEG 55.0 [45.0 - 66.0]; $p = 0.004$ | Preferência AR EEG 3.0 [3.0 - 5.0] VEEG 35.0 [14.0 - 35.0]; $p = 0.011$ | Preferência HR EEG 5.0 [5.0 - 7.0] VEEG 59.0 [59.0 - 61.0]; $p = 0.031$; teste T pareado com correção FDR-BH).

Mais uma vez, a maior capacidade de identificação de padrões eletrográficos do VEEG revelou um efeito não observado naquelas análises provenientes dos registros de iEEG. Apesar de não serem o foco da ictogênese aguda, os circuitos registrados nas amígdala apresentaram a tendência de se especificar em uma só crise. Observe que os CPCs chegaram a somar cerca de 25% dos *clusters* envolvidos na crise 7.

4.3. Histologia

A análise histológica revelou que, no geral, os eletrodos de registro atingiram a região alvo com um erro de 0,697 [0,439 0,862] para o Protocolo 1 e 0,449 [0,301 0,634] para o Protocolo 2, como apresentado pela Figura 22. Além disso, todos os eletrodos de estimulação acertaram a amígdala esquerda (0,583 [0,527 0,958]) naqueles animais do Protocolo 1 (Figura 22A painel IV), assim como as cânulas de administração de KA atingiram o hipocampo ventral esquerdo (0,544 [0,346 0,670]) nos animais do Protocolo 2 (Figura 22B painel IV).

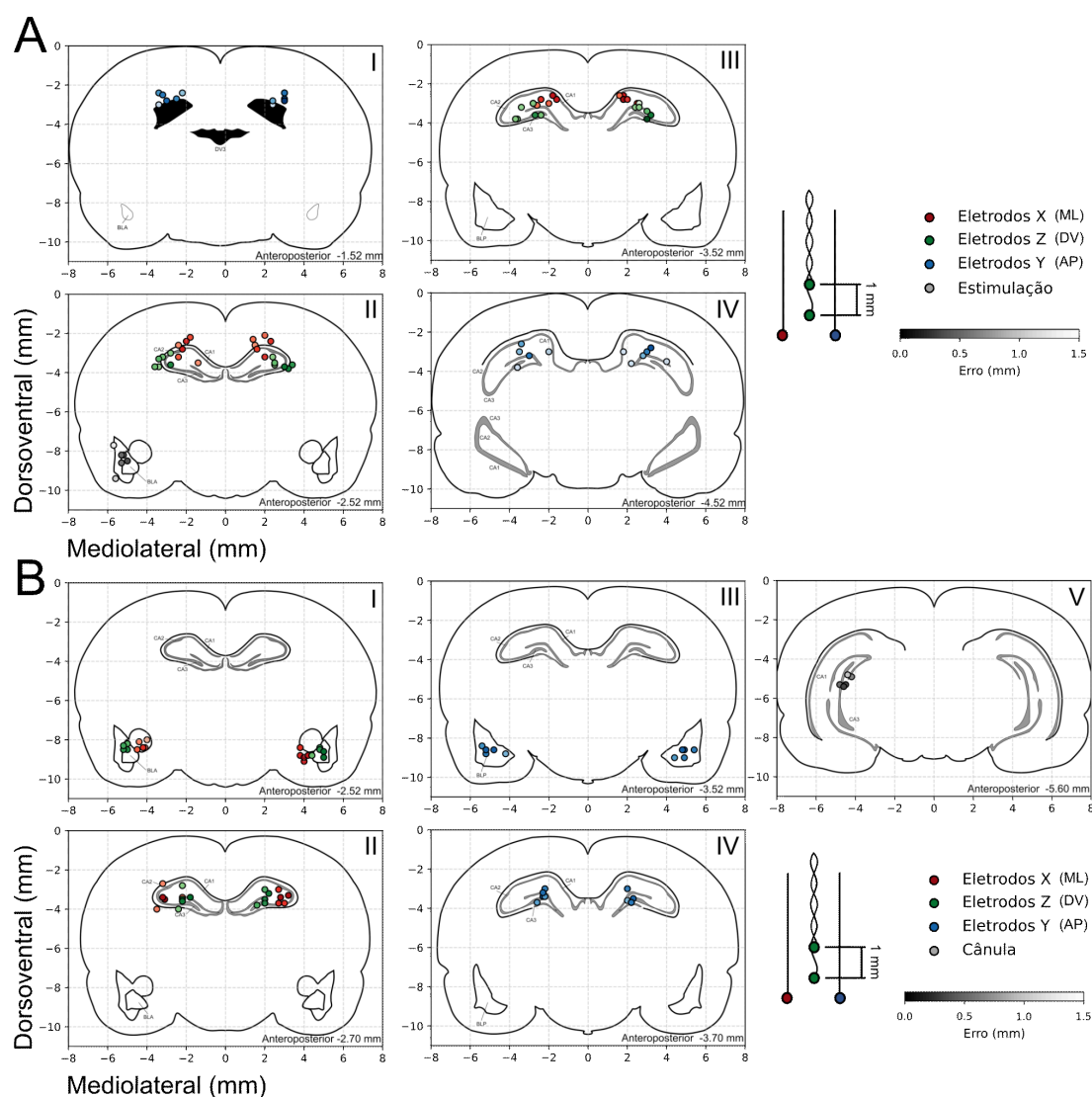


Figura 22 - Análise histológica para confirmação do posicionamento dos eletrodos e cânulas.

(A) Análise histológica do Protocolo 1. (B) Análise histológica do Protocolo 2. Para ambas as figuras cada um dos painéis representa um corte coronal, as cores se referem às posições dos eletrodos no conjunto de VEEG e o degradê tem relação com o erro em relação à coordenada estereotáxica esperada (quanto mais claro, maior o erro).

5. DISCUSSÃO

A discussão a seguir inicialmente aborda tópicos de análise comum aos dois protocolos, em seguida, explora os resultados de ambos de forma separada; não só apresentando aspectos importantes dos achados e das técnicas aplicadas, mas também abordando as limitações observadas e perspectivas para futuras pesquisas.

No geral, a aplicação do VEEG para a melhor segregação de circuitos aprimorou a capacidade em descrever fenômenos da dinâmica do processo ictogênico e central para o desenvolvimento deste trabalho. Portanto, a primeira etapa executada foi a elaboração de estratégias para identificação e classificação desses componentes neurais, por meio das amostras vetoriais. Embora existam diversas soluções para caracterização de espículas, identificação de princípio de crises epilépticas e análise de componentes da crise, como sincronismo entre áreas (Cai et al., 2022; Rodrigues & Cota, 2024; Quitadamo et al., 2018), foi necessário elaborar técnicas que permitissem identificar e classificar trajetórias tridimensionais.

Apesar da tentativa de adaptação de métodos já implementados, como na previsão de trajetórias de tráfego ou de granizos em tempestades (Adams-Selin, 2023; Lee et al., 2007; Yang et al., 2022), nenhum pareceu se adequar às necessidades experimentais impostas. O esforço em criar um algoritmo robusto de agrupamento também passou por classificadores tradicionais (Ankerst et al., 1999; Lloyd, 1982), alimentados por diferentes características vetoriais ou por matrizes de similaridade medidas pela distância espacial entre as trajetórias (Choi et al., 2020). Contudo, os melhores resultados foram obtidos pela utilização de “correspondência de modelo” (no inglês, *template matching*) na sua modalidade multidimensional, aplicada à padrões eletrográficos selecionados manualmente ou por algoritmos de identificação de pico (Figuras 9, 10 e 17) (Law, 2019).

A classificação delimitou grupos de eventos que visualmente se assemelham no tempo e no espaço tridimensional e foram apresentados como biomarcadores de circuitos neurais. Curiosamente, em 2000, Moraes et al. apresentou as amostras vetoriais de diversos pontos do mesencéfalo de ratos como vetores momentâneos (uma amostra temporal) conjugados à

estimativa de densidade de fonte de corrente. O processo foi demonstrado dinamicamente por meio de um vídeo da atividade da via primária auditiva. Em 2001, Moraes & Garcia-Cairasco apresentaram o VEEG como uma nuvem de pontos no espaço e associaram circuitos a *clusters* de amostras tridimensionais estáticas no tempo (conjunto de pontos). Entretanto, somente no presente trabalho foi explicitamente adicionado o conceito de trajetória vetorial para discriminação de circuitos, apesar de esses padrões espaço-temporais já serem relacionados a biomarcadores da atividade neural nas demais publicações.

Após a concepção da rotina de análise, foi possível mostrar aspectos da evolução do acoplamento dos circuitos neurais aos estímulos durante o processo ictal, por meio do Protocolo 1, que apresenta características não observadas nos dados de potência do iEEG. Inicialmente, a estimulação da amígdala basolateral esquerda apresentou potenciais evocados em ambos os hemisférios, com um maior recrutamento do hipocampo ipsilateral ao estímulo (Bass & Manns, 2015; McDonald & Mott, 2017). Além disso, rejeitou-se a hipótese de que os ERPs poderiam estar relacionados estritamente aos ruídos gerados pela estimulação.

Os resultados da Figura 12 mostram que a magnitude e potência instantânea se relacionam com um aumento de excitabilidade nos momentos que antecedem a crise (Medeiros et al., 2014; Yang et al., 2019). Além disso, ambas as grandezas apresentam resultados compatíveis em todos os conjuntos de VEEG e indicam que os circuitos recrutados não estão necessariamente contidos em uma única região hipocampal, conforme também mostrado por outros estudos (Mesquita et al., 2011). Caso contrário, os eletrodos apresentariam um aumento de potência instantânea (nesse caso, representada pelo eletrodo central de cada conjunto), mas a magnitude vetorial seria percebida pelos conjuntos de forma diferente.

A dispersão angular por outro lado, é uma medida inversamente proporcional ao nível de acoplamento dos circuitos em relação ao estímulo e pode revelar um outro aspecto da dinâmica ictogênica. Uma dispersão média elevada (próxima a 1) expõe uma maior variedade de circuitos recrutados em um janela de estímulos, ou, no máximo, uma consistência restrita e momentânea, como nos segundos que sucedem a estimulação (Figura 12 e

13). Isso porque a direção de cada amostra vetorial está difusa de suas correspondentes nas janelas adjacentes. A Figura 13 expõe exatamente esse aspecto, uma maior dispersão representa uma menor repetibilidade das trajetórias e, portanto, um menor acoplamento do circuito ao estímulo. Esse fenômeno pode ser visto principalmente no período pré-ictal, no qual as trajetórias mostradas não possuem repetibilidade, diferentemente do que é mostrado a partir do evento ictal.

O aumento da magnitude e da potência em relação ao período basal mostrados pela Figura 12, são, juntos, bons indícios de que a quantidade de circuitos recrutados passa a crescer durante o período pré-ictal. Entretanto, a manutenção da dispersão angular aponta que esse aumento de excitabilidade não reflete em uma imediata organização ou acoplamento dos circuitos envolvidos. Foi mostrado que, somente pouco antes das crises, as trajetórias evocadas pelos estímulos passaram a apresentar um comportamento estereotipado. Os resultados da Figura 14 vão além, reforçam as observações anteriores e permitem a avaliação da dinâmica do fenômeno, evidenciando que o estado de excitabilidade parece aumentar progressivamente até o período ictal.

Contudo, outro aspecto importante é revelado: após o início da crise, a dispersão angular reduz e eleva a porcentagem de amostras abaixo do limiar, indicando um maior acoplamento dos circuitos ao estímulo e, portanto, uma maior consistência das trajetórias durante as janelas de estimulação. De fato, como mostrado em trabalhos anteriores, o estímulo exógeno aplicado à amígdala pareceu conduzir os osciladores internos disparados pelo PTZ (Bass & Manns, 2015; Medeiros et al., 2014). Além disso, os dados evidenciam que esse acoplamento dinamicamente tende a recrutar um circuito específico em pelo menos uma parte da janela de estimulação. Se de fato a trajetória indica indiretamente o circuito recrutado, a diminuição da dispersão angular é um biomarcador da convergência de um circuito em um dado momento.

A excitabilidade evidenciada pela potência do iEEG e pela magnitude do VEEG, apesar de ainda maior que o basal, reduz no estado pós-ictal retornando a valores próximos ou abaixo daqueles registrados no período pré-ictal. Entretanto, a porcentagem de amostras com baixa dispersão angular

é mantida. Logo, se antes existia um aumento de excitabilidade generalizado, sem uma evidente relação entre as trajetórias e os estímulos, agora o cenário é um pouco diferente. A excitabilidade aumentada é acompanhada, até o final do experimento, por uma maior consistência em termos das trajetórias registradas, e, portanto, um explícito acoplamento dos circuitos ao estímulo. Outra possibilidade, que ainda devemos investigar melhor, é que distintos circuitos podem apresentar uma sequência de ativação reprodutível, indicando a formação de um circuito reverberante, formado pela ativação sequencial de distintas trajetórias.

Resultados complementares foram encontrados nas análises dos eventos e dos *clusters* de trajetórias (Figura 16). Antes mesmo da crise foi possível identificar uma variedade de eventos de magnitude vetorial anormal, demonstrando, mais uma vez, o aumento na atividade e excitabilidade do tecido. De forma muito semelhante ao observado por Medeiros et al. (2014) em registros corticais, os eventos de VEEG também sincronizam ao estímulo logo antes do início da crise (Figura 16E). Além disso, foi evidenciada a manutenção deste sincronismo no período pós-ictal. Estes dados são evidência, assim como em Pinto *et al.* (2017), de que a instabilidade na homeostase de circuitos ictogênicos (ou da própria condição da epilepsia) está associada a uma facilitação de acoplamento das redes subjacentes a estímulos externos (Pinto et al., 2017). Esta característica pode ser explorada, como sugerido em trabalhos anteriores, para prever, diagnosticar e tratar crises convulsivas.

Assim como as observações anteriores, o número de eventos de trajetória identificados e a variedade de *clusters* no período pré-ictal (Figuras 16A e 16B), corroboram com a ideia de que existe uma competição, ou pelo menos uma atuação deliberada de diversos circuitos nos momentos que precedem uma crise (Jirsa et al., 2014; Paz & Huguenard, 2015). Esse raciocínio converge com a baixa porcentagem de amostras acima do limiar de dispersão angular das janelas de ERPs e alta excitabilidade mostrada por meio da potência instantânea do iEEG e da magnitude vetorial. O oposto ocorre com o período pós-ictal, a diminuição no número de eventos, o menor número de *clusters*, a não uniformidade da distribuição temporal dos eventos de trajetórias e a diminuição da dispersão angular, são evidências de que o

processo convergiu à um ou poucos circuitos estritamente acoplado à estimulação elétrica (Chen, 2017).

Os resultados extraídos da matriz de transferência entre *clusters* e da entropia da sequência de *clusters* apontam para a mesma direção. Em todas as regiões registradas, eventos de trajetória de VEEG do pós-ictal tem maior probabilidade de sucederem eventos do próprio *cluster*, além de estarem inseridos em sequências menos caóticas (Figuras 16D, 16F e 16G). Foi mostrado também que aqueles *clusters* ocorridos no período pré-ictal, não ocorrem no período subsequente e vice-versa. Ainda, eventos pós-ictais são mais duradouros, indicando um maior número de componentes nos circuitos (Figura 16C e 16D).

Os presentes achados encontram respaldo teórico na visão de Paz e Huguenard (2015), que trataram a epilepsia como uma doença da interação de microcircuitos, para além da visão clássica de hipersincronia. De fato, as observações traçadas para a fase pré-ictal ilustram a ictogênese como um recrutamento progressivo e competitivo de redes neurais, refletindo um desequilíbrio entre diferentes tipos de unidades estruturais de microcircuitos que precede a crise organizada (Y. Chen, 2017; Stead et al., 2010).

Em contraste, a convergência para um circuito dominante no estado pós-ictal, que progressivamente deixa de ter competidores, evidenciam a emergência de uma via de excitação recorrente patologicamente facilitada, formando uma rede epiléptica hiperconectada. Essa via dominante passa a funcionar como um ponto de estrangulamento (*choke point*) funcional da rede, oferecendo, assim, uma evidência dinâmica para a visão de que a epilepsia é uma doença de circuitos em interação (Paz & Huguenard, 2015). O impacto desta hipótese é que o processo fisiológico de transmissão de longo-alcance entre estruturas cerebrais, utilizando codificação temporal em neurônios-nós na topologia de rede neuronal de mundo-pequeno, poderia estar sendo “sequestrado” por uma condição patológica que favorece o hiper-acoplamento (Beenhakker & Huguenard, 2009).

Traçando um paralelo, modelos computacionais “*Winner-Take-All*” (WTA) são utilizados para a compreensão de como o cérebro discrimina estímulos e forma mapas sensoriais funcionais, especialmente relevantes ao hipocampo. Neles, neurônios competem entre si de tal forma que, para um

estímulo, apenas um pequeno subconjunto de neurônios se torna ativo enquanto inibe os demais componentes da rede. Por meio deste tipo de modelagem, foi mostrado como a topologia de inibição circundante e a força sináptica podem alterar de um estado epiléptico rítmico para saídas estáveis WTA (Chen, 2017). Essa transição de estado de certa forma parece se correlacionar com os resultados apresentados até aqui, no qual uma rede instável passou a ser representada por um único circuito acoplado ao estímulo, enquanto os demais foram preteridos. Os resultados corroboram esta hipótese.

O estado pós-ictal de facilitação não se estendeu até o final do experimento para todos os animais e, em alguns casos, até foram registrados outros eventos ictais. Apesar disso, o fenômeno de acoplamento neural, anteriormente descrito, foi consistente e a via foi recrutada mesmo segundos após o término da crise. Essas observações não corroboram com a teoria da exaustão neural, assim como já vem sendo mostrado na literatura (Fisher & Schachter, 2000; Pottkämper et al., 2020).

Por outro lado, no período pós-ictal, aquelas janelas imediatamente após o estímulo se mantêm com energia e magnitude aumentada e as demais retrocedem (Figura 15B), o que mostra uma diminuição da atividade geral conforme já mencionado (Figura 14B). O raciocínio é bem exemplificado pela Figura 13, na janela 300, na qual as trajetórias e os potenciais (iEEG) parecem ocorrer sem nenhum ruído. Dessa forma, as alterações fisiológicas levaram à diminuição da atividade residual, mas não impediram a propagação da informação pela via facilitada. Uma possível causa é o desbalanço entre a via hiperconectada, que foi plasticamente facilitada, e a depressão das demais, ocasionada pela ação de bombas hiperpolarizantes, aumento do potássio extracelular, diminuição do cálcio extracelular, acidificação intracelular e pela inibição ativa como no modelo de WTA (Fisher & Schachter, 2000; Pottkämper et al., 2020).

É interessante notar que, se não fosse pelo estímulo externo “dirigindo” o circuito, a energia no período pós-ictal seria reduzida pelos mesmos mecanismos mencionados acima (descrito na literatura como depressão eletrográfica) e possivelmente o circuito facilitado permaneceria igualmente silente. A permanência da estimulação mesmo após crise parece perpetuar o

circuito favorecido, entretanto, uma abordagem complementar seria adicionar um grupo com estimulação somente até a identificação da primeira crise ou outro grupo com estimulação apenas após a identificação da primeira crise. Dessa forma, poderia ser estudado como a estimulação interage com o circuito prevalente, se ela o promove ou apenas o sincroniza.

Foi mostrado também que as redes neurais acopladas ao estímulo externo tem um comportamento preditivo da ocorrência do mesmo (Figura 15B, resposta aumentada antes da aplicação do estímulo). Circuitos que envolvem comportamento de recompensa tem propriedades semelhantes, com a casca e o centro do Núcleo Accumbens (i.e. shell and core) - com a casca associada à valência do estímulo emocional mas, o centro, ao aprendizado de como dicas ambientais preveem uma futura recompensa. Aparentemente, uma vez que o circuito icogênico ganha controle do sistema, a capacidade de responder previamente à aplicação do estímulo é perdida.

Outro importante fator a ser considerado é que o Protocolo 1 foi executado em animais anestesiados por uretano, que, de uma forma geral, suprime as transmissões sinápticas glutamatérgicas, importantes na sinalização inter e intra estrutural na região límbica (Beitchman et al., 2023), e reduz as oscilações espontâneas, principalmente no hipocampo, o que resulta na diminuição da atividade sináptica e do sincronismo de neurônios (Ward-Flanagan et al., 2024; Yagishita et al., 2020). Apesar disso, o uretano não foi suficiente para prejudicar a sondagem do sistema e o acoplamento neural, pareceu inclusive viabilizar uma menor competição ao circuito “ganhador” facilitando o aparecimento de um potencial evocado do nível basal caracterizada pela atividade neural difusa.

Espera-se que, na ausência do uretano, a atuação de mais circuitos pode acarretar em uma maior complexidade na identificação de padrões de trajetórias e, conseqüentemente, na omissão ou supressão de alguns dos fenômenos registrados. De fato, em um trabalho de 2018, Medeiros *et al.* mostrou que o expressivo aumento do sinal de potencial evocado em animais não tratados com uretano, anterior à atividade eletrográfica ictal, só ocorre se previamente pareado com crises anteriores, criando uma facilitação de acoplamento obviamente dependente de alterações plásticas no circuito (Medeiros et al., 2018).

Por fim, assim como abordado por Medeiros *et al.* (2014), a estimulação da amígdala em baixas frequências se mostrou uma ferramenta interessante para a previsão de crises, uma vez que a via estudada estabeleceu um acoplamento anormal ao estímulo exógeno, causando alterações antecipadas ao evento ictal. Esse fenômeno foi percebido tanto pelas trajetórias identificadas e suas relações temporais com o estímulo (cerca de 30 segundos), quanto pela amplitude do iEEG e magnitude do VEEG (cerca de 300 segundos). No caso deste trabalho, a latência de previsão está atrelada à taxa de administração do PTZ, entretanto, o fenômeno de acoplamento, prévio à crise, parece ser amplamente reprodutível.

Principalmente se validada em desenhos experimentais de livre movimentação com crises espontâneas e recorrentes (modelo epileptogênico), a estimulação da amígdala (0,5Hz), aliada à utilização do VEEG (assim como registros de iEEG) pode representar uma boa tática para aplicações em malha fechada (Krook-Magnuson *et al.*, 2013; Stieve *et al.*, 2023). De fato, o surgimento de trajetórias repetidas e a organização da distribuição temporal de eventos em relação ao estímulo, parecem antever os eventos ictais.

Um ponto do presente trabalho que poderia ter sido melhor aprofundado tanto com a execução de novos experimentos, quanto com uma análise de dados diferente se refere à triangulação de múltiplos registros de trajetórias de campo elétrico. Isso permitirá a identificação da origem espacial dos circuitos neuronais, semelhante ao apresentado para potenciais evocados por Moraes e Garcia-Cairasco (2001) e para crises convulsivas de GEPRs por Moraes *et al.* (2005). A utilização de um maior número de arranjos com espaçamentos menores poderia melhorar a diferenciação de componentes dos circuitos hipocâmpais envolvidos na crise convulsiva.

Os resultados do Protocolo 2 apontam que, durante o *status epilepticus*, o VEEG foi capaz de identificar um número significativamente maior de padrões eletrográficos em comparação com a mesma rotina de análise aplicada à dados de iEEG (20C e 21B). Isso corrobora com a hipótese de que a técnica possui uma maior capacidade de distinguir circuitos se comparada ao iEEG e sugere que a abordagem tradicional, focada na

morfologia do sinal do LFP, pode ocultar a verdadeira complexidade da competição de circuitos, agrupando erroneamente a atividade de componentes distintos como um único evento (Buzsáki et al., 2012; Einevoll et al., 2013; Stead et al., 2010).

De fato, os potenciais elétricos gerados por uma população neuronal que se propagam através do tecido cerebral condutor são atenuados conforme um filtro passa-baixa espacial, mesclando a atividade de fontes neuronais distintas, mas espacialmente próximas. Como consequência, as ativações de múltiplos micro circuitos independentes podem ser fundidas em um único evento de grande amplitude registrado por um canal de iEEG, levando a uma subestimação da verdadeira complexidade da rede (Kajikawa & Schroeder, 2011).

Em termos de eventos e *clusters* identificados, o VEEG foi capaz de revelar uma maior variedade de padrões eletrográficos. Se por um lado a qualidade da informação obtida pela técnica foi mostrada pelos resultados do Protocolo 1, por meio da análise de aspectos inerentes somente ao processo de vetorização das amostras, o Protocolo 2 comprovou que a técnica, no mínimo, pode gerar uma quantidade maior de dados.

Este dado sugere um importante aspecto da análise de assinaturas eletrográficas associadas a circuitos específicos ativados nas redes neurais subjacentes. Assim como descrito na revisão bibliográfica, a assinatura eletrográfica da resposta evocada por estímulo exógeno apresenta uma morfologia padrão, associada à atividade de cada relé-sináptico (primordialmente excitatória, uma vez que atividade inibitória gera campos extracelulares de baixa intensidade) da via neuronal estudada (Moraes & Garcia-Cairasco, 2001; Moreira et al., 2025; Ross & Hamm, 2020). Outros circuitos, ou componentes de circuitos, também apresentam assinaturas características mesmo quando espontâneas, sem nenhum estímulo exógeno, como as *sharp-wave and ripples*, descargas *spike-and-wave*, *k-complex* e *spindles* (Buzsáki, 2015; Steriade, 2006). Logo, o fato do VEEG ser mais sensível para detectar padrões/clusters diferentes pode significar que a mesma assinatura eletrográfica na série temporal do potencial elétrico de um eletrodo pode estar associada a diferentes circuitos neuronais recrutados. Desta forma, a técnica do VEEG poderá ser útil para identificar situações na

qual assinaturas eletrográficas foram associadas a processos aparentemente contraditórios (Tousseyn et al., 2014; Woldman et al., 2020).

Em relação ao método de detecção de padrões, é difícil avaliar até que ponto a detecção de circuitos por meio do iEEG pode ser aprimorada sem uma correlata melhoria na detecção por meio do VEEG. Mesmo assim, avanços vêm sendo feitos no intuito de identificar marcadores eletrográficos que possam identificar zonas ictais ou prever redes a caminho da instabilidade (Sundrani et al., 2025). Sob a aplicação de uma mesma rotina de análise, foi evidente a superioridade do VEEG em identificar padrões utilizando uma mesma base de dados. Parece improvável que as componentes do VEEG possam vir a fornecer uma menor quantidade ou qualidade de informações do que aquelas obtidas por um simples eletrodo.

Adiante, foi demonstrado que o número de eventos e de *clusters* cresceu com o passar das crises (Figura 19A). Isso sugere que circuitos são modificados e passam a se enquadrar em outro grupo ou são simplesmente incorporados à rede epiléptica. De qualquer forma, isso parece aumentar progressivamente a complexidade do sistema envolvido nas sucessivas crises. Seria interessante ver se esta tendência se mantém ou retrocede com o processo epileptogênico, na qual alterações plásticas favorecem o aparecimento de atividade epileptiforme espontânea - o MicroMAP, apresentado no Capítulo II, foi desenhado para exatamente este objetivo.

A mesma relação não pode ser traçada a partir dos dados de iEEG, nos resultados apresentados pela Figura 19B, somente foi possível verificar a progressão da diversidade de eventos naqueles eletrodos no hemisfério ipsilateral à administração do KA. Contudo, não há evidência de que uma maior quantidade de *clusters* passou a integrar a rede conforme mostrado no caso vetorial, dando a entender que o processo, uma vez deflagrado, somente aumentou a atividade, mas não a complexidade de circuitos recrutados. Isto pode indicar que os mecanismos de competitividade entre circuitos e/ou acoplamento preferencial estão melhor preservados do lado contralateral à injeção focal com KA. Contudo, existe a possibilidade de que este circuito só apresente seus mecanismos homeostáticos preservados durante a fase aguda, mas que possa apresentar disfunções semelhantes

durante o processo epileptogênico (pós período latente para o aparecimento de crises espontâneas e recorrentes).

A atividade eletrográfica observada nos dados registrados corrobora com os resultados da literatura, que mostram o recrutamento de ambos os hemisférios durante o *status epilepticus*. Embora o dano tecidual subsequente à administração do KA seja reservado apenas ao lado ipsilateral, podendo causar diferenças em termos de amplitude e energia do sinal, as análises delimitadas no presente estudo abordam a caracterização dos circuitos epiléticos somente pelos eventos e *clusters* identificados. Sob essa ótica, apenas o VEEG pode mostrar modificações dinâmicas em todas as áreas registradas. (Arcieri et al., 2014; Carriero et al., 2012; Chen et al., 2013). Vale ressaltar, contudo, que apesar das evidências de recrutamento generalizado (hemisfério contralateral), evidências de um processo plástico de curto prazo entre a primeira e última crise só são percebidas no hemisfério ipsilateral (Le Duigou et al., 2008).

Adiante, a separação dos *clusters* em janelas pré-definidos da crise (CPJC) revelou, exclusivamente para os dados de VEEG, uma característica dos circuitos registrados: enquanto uma proporção fixa atua indiscriminadamente em todos os momentos de cada evento ictal, uma outra parcela possui preferência por determinada janela. Interessantemente, a proporção de CPJC foi inalterada durante as sucessivas crises, mesmo com o aumento do número de eventos e *clusters* registrados (Figura 19C).

Ainda, os dados mostram que não existe uma porcentagem maior de circuitos específicos para alguma das janelas em detrimento das outras, independente do hemisfério registrado. Apesar da diferença encontrada entre a proporção de CPJC entre as amígdalas no primeiro terço das crises, os efeitos gerais percebidos na progressão do *status epilepticus* são semelhantes entre todas as regiões.

Se de fato cada CPJC se relaciona à alguma das fases do processo ictal (gênese, sustentação ou abolição), as regiões parecem ter a capacidade de atuar individualmente nos três estados. Entretanto, uma melhor verificação da origem desses padrões e da causalidade entre esses circuitos deve ser traçada, tanto em relação às diferentes áreas, quanto em relação àqueles circuitos sem preferência de atividade.

O estudo também evidenciou que uma parcela de circuitos somente ocorre em uma crise e não mais em outra (Figura 21A). Ainda, esse filtro revelou uma tendência crescente da proporção de *clusters* nas amígdalas. Ou seja, quanto mais crises sucessivas, maior foi a porcentagem de *clusters* específicos àquela crise. Se considerarmos que os eventos da primeira crise possuem mais tempo (ou mais crises) e portanto, maior probabilidade de se repetirem do que aqueles registrados na sexta crise, por exemplo, podemos afirmar que novos tipos de circuitos são incorporados na rede, uma crise por vez, já que aqueles registrados de forma tardia nunca antes foram identificados, caso contrário, não seriam específicos àquela crise.

Isso demonstra uma importante correlação da amígdala com os eventos ictais e a evolução do *status epilepticus*, apesar de não explicitar como esse envolvimento se relaciona aos demais circuitos e quais os motivos dessa maior participação. Mais uma vez, essas observações só foram possíveis com o VEEG que novamente também apresentou um maior número de CPCs identificados.

Por fim, vale ressaltar que todos os experimentos foram gravados, entretanto não foram aplicadas análises comportamentais aos registros (Racine, 1972). Além disso, assim como mostrado por Arcieri *et al.* (2014) e antes por Carriero *et al.* (2012), existiu uma variabilidade em termos de número de crises em relação aos animais, sendo registradas de 2 a 17 eventos ictais. Além disso, o registro de iEEG se mostrou heterogêneo entre os animais, o que dificultou a análise como um todo. Entretanto, isso reflete um aspecto importante, mesmo em um conjunto de dados complexo, o VEEG parece ter conseguido identificar circuitos, assim como isolar características do sistema. A heterogeneidade, contudo, pode ser uma característica intrínseca ao processo ictogênico, onde o favorecimento de circuitos pode ser altamente dependente de características individuais de cada animal. Uma forma de testar esta hipótese é trabalhar com animais geneticamente modificados ou selecionados de forma a gerar um grupo mais uniforme.

A tática de análise adotada neste trabalho levou em consideração que a distinção dos períodos da crise poderia levar a uma compreensão direta da dinâmica da crise. Em outras palavras, foi testada a existência de um padrão de ativação de circuitos que pudesse mostrar qual das regiões era mais

propensa a ocorrer em determinada fase do processo ictal. O questionamento guiou o raciocínio da análise, entretanto, não é a única estratégia para filtrar as trajetórias e nem muito menos a única forma de se correlacionar sintomas de causa e efeito durante o processo ictogênico.

Por meio dos resultados apresentados, tanto para o Protocolo 1, quanto para o Protocolo 2, o VEEG se mostrou uma ferramenta útil na identificação de circuitos e de fenômenos não captados por meio dos registros de iEEG convencionais. Entretanto, ainda tem muito para se explorar e desenvolver, não somente em como correlacionar os padrões de *clusters* aos processos da epilepsia, mas também em como identificar e classificar aqueles eventos tridimensionais.

6. CONCLUSÃO

O presente capítulo utilizou a técnica de VEEG como ferramenta para a análise da dinâmica ictogênica. Por meio de dois protocolos complementares, buscou-se caracterizar a organização dos circuitos neurais envolvidos na deflagração e na característica de sucessivas crises, bem como explorar a possibilidade de identificação de biomarcadores dinâmicos que antecedem os eventos ictais.

Os resultados demonstraram que o período pré-ictal é caracterizado por um estado de alta excitabilidade e competição entre múltiplos circuitos neurais. Isso foi evidenciado pela elevada magnitude vetorial e potência do iEEG, acompanhadas, contudo, por uma alta dispersão angular, indicando baixa consistência nas trajetórias evocadas. Em contrapartida, a transição para o estado ictal e o período pós-ictal revelaram uma notável convergência para um ou poucos circuitos dominantes. Este fenômeno foi marcado por uma drástica redução na dispersão angular e na entropia das sequências de eventos, apontando para o estabelecimento de uma via patologicamente facilitada e estritamente acoplada ao estímulo exógeno.

O estudo comparativo no modelo de epilepsia focal corroborou a superioridade do Vector-EEG em relação ao iEEG convencional na distinção de padrões eletrográficos. A técnica vetorial revelou uma complexidade oculta na dinâmica da rede, identificando um repertório significativamente maior de

circuitos e um aumento progressivo na complexidade do sistema ao longo das crises sucessivas, que não foi observado pela análise similar aplicada aos dados de LFP.

Em conjunto, os achados deste capítulo sustentam a hipótese de que a adição da característica espacial aos registros eletrofisiológicos, intrínseca ao Vector-EEG, permite a identificação e classificação de uma maior quantidade de informações do que aquelas oferecidas somente pelo uso de amostras de LFP. Além disso, confirmaram a existência de uma dinâmica de competição e seleção de circuitos que rege o processo ictogênico.

As observações alinham-se com o paradigma da epilepsia como uma doença de redes em interação, e não apenas de hipersincronia. Dessa forma, o Vector-EEG emerge não apenas como uma ferramenta de análise robusta, mas também como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de biomarcadores mais precisos, com potencial para avançar tanto no diagnóstico quanto em estratégias terapêuticas para a epilepsia.

CAPÍTULO II

MicroMAP: Sistema Multicanal de
Baixo Custo para Aquisição de Dados
Eletrofisiológicos

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos circuitos mais caudais do sistema nervoso, como aqueles envolvidos no controle sensório-motor, é amplamente aceito que uma sequência linear de ativação neuronal é essencial e suficiente para a transmissão fidedigna da informação (Sherrington, 1906). No início do século XX, a partir dos trabalhos de Adrian e Zottermann, Louis Lapicque articulou esse conceito por meio de um modelo matemático do neurônio conhecido como *integrate-and-fire* (integração e disparo). Esse modelo simplificado propõe que o potencial de membrana de um neurônio integra sinais elétricos provenientes de múltiplas sinapses excitatórias e/ou inibitórias e gera, ao atingir um limiar, um potencial de ação. Esse arcabouço conceitual moldou a compreensão da neurociência sobre a complexidade do sistema nervoso ao vincular regiões anatômicas específicas a funções distintas, postulando que a taxa de disparo desses núcleos reflete a intensidade da característica codificada.

Diversas descobertas, especialmente aquelas envolvendo o cérebro, reforçaram esse modelo, particularmente após os trabalhos pioneiros de Penfield (Penfield & Boldrey, 1937; Penfield & Rasmussen, 1950). No entanto, características anatômicas locais e conexões físicas diretas não conseguem explicar plenamente as propriedades emergentes mais complexas dos circuitos neurais, como aquelas envolvidas no processamento visual, na memória e nas emoções. Sendo assim, uma abordagem mais dinâmica — isto é, um conectoma funcional organizado temporalmente — para o processamento em redes neurais pode ser mais conveniente. Nesses níveis superiores de processamento, a dinâmica da ativação neuronal e a capacidade do cérebro de integrar informações entre regiões espacialmente distribuídas de forma simultânea tornam-se alvos críticos de investigação (Varela et al., 2001).

Um número crescente de evidências destaca o papel fundamental das fases de disparo neuronal na codificação e decodificação de informações dentro dos circuitos neurais. Em vez de se basearem exclusivamente na taxa de disparos, esses estudos enfatizam a importância do tempo de ocorrência dos potenciais de ação em relação à atividade oscilatória em andamento, sendo esse um mecanismo essencial de codificação neural (Montemurro et al.,

2008; Reddy et al., 2021). Achados complementares demonstram que essas oscilações desempenham um papel central na organização temporal da ativação neuronal (Buzsáki & Tingley, 2018; Petersen & Buzsáki, 2020). As dinâmicas oscilatórias permitem a comunicação seletiva entre regiões cerebrais anatomicamente distantes por meio da sincronização de fase, apoiando assim a integração de informações distribuídas em redes funcionais de média e grande escala.

Essa coordenação temporal aprimora a eficácia sináptica e estabelece janelas críticas de plasticidade e o direcionamento de informações, contribuindo, em última instância, para processos cognitivos complexos. Um único disparo neuronal ocorre em uma janela temporal de aproximadamente 1 a 2 milissegundos, e a maioria das oscilações neurais se situa na faixa de 2 a 250 Hz — sendo que oscilações mais rápidas estão tipicamente associadas à integração local, enquanto as mais lentas se relacionam à comunicação de longa distância (Varela et al., 2001). Diante disso, a eletrofisiologia se destaca como o método mais apropriado para investigar tanto a origem de determinada atividade cerebral, quanto para decifrar a sua dinâmica, uma vez que possui resolução temporal suficiente para tal.

Embora grande parte da atenção tenha sido direcionada à investigação da micro circuitaria local por meio do uso de múltiplos eletrodos espaçados por dezenas de micrômetros (por exemplo, sondas de silício ou, no inglês, *silicon probes*), uma configuração de múltiplos eletrodos em múltiplas regiões, pode ser fundamental para o exame do processamento de informações em larga escala na neurociência experimental, especialmente por meio de implantes profundos.

Além disso, registros com múltiplos eletrodos permitem a caracterização da sequência temporal de ativações entre diferentes regiões cerebrais, bem como a identificação de populações neuronais com base em seus padrões de sincronização e transferência de informação. Em relação à resolução espacial, esta depende principalmente do tipo e quantidade de eletrodos utilizados. Uma vez que cada ponto de registro está atrelado a atividade eletrográfica de uma área restrita em sua proximidade.

A miniaturização de sistemas eletrônicos e a evolução da engenharia de materiais aumentaram significativamente o número de eletrodos que podemos

registrar simultaneamente. Esse processo foi essencial também para maximizar a razão sinal-ruído em registros eletrofisiológicos, pela capacidade de se aproximar fisicamente a digitalização dos sinais dos eletrodos e, conseqüentemente, reduzir a quantidade e o tamanho das conexões portadores de sinais analógicos. Além disso, contribuiu para minimizar a interferência em tarefas comportamentais, pela diminuição do peso total dos equipamentos (Siegle et al., 2015, 2017; Steinmetz et al., 2018, 2021)

O crescimento da quantidade de canais registrados em experimentos de eletrofisiologia coincide com a ascensão de iniciativas de código aberto, que, nas últimas décadas, influenciaram positivamente o desenvolvimento tecnológico e científico ao promover o compartilhamento de informações, oferecer aos pesquisadores uma rede colaborativa e ampliar a acessibilidade e a diversidade de técnicas (Siegle et al., 2015).

Sistemas de código aberto como o A/D, NeuroRighter e Open Ephys (OE), juntamente com outros marcos tecnológicos como Arduino, Raspberry Pi, NeuroPixel e GitHub, desempenharam papéis cruciais em dois fenômenos importantes na evolução das metodologias de aquisição e análise de sinais eletrofisiológicos: o aumento do número de canais e a redução do custo por canal registrado (Newman et al., 2013; Siegle et al., 2015; Steinmetz et al., 2018).

Apesar dos avanços tecnológicos significativos, os registros multicanal ainda apresentam custos elevados — especialmente quando o objetivo é investigar a comunicação entre circuitos neurais distintos, o que requer registros simultâneos em múltiplas regiões. Além disso, estudos voltados para circuitos em escala mesossegmentar — particularmente aqueles envolvidos na integração de médio e longo alcance — são mais efetivamente conduzidos por meio de potenciais de campo local (LFPs, do inglês *local field potentials*), ao invés de registros da atividade de unidades isoladas (Varela et al., 2001).

Nesses contextos, os sistemas eletrofisiológicos de aquisição considerados padrão-ouro podem ser desnecessariamente complexos, oferecendo capacidades computacionais que superam as exigências do experimento. Esses sistemas, tipicamente projetados para registros de unidades isoladas, envolvem custos mais altos devido à necessidade de altas taxas de amostragem por canal — frequentemente superiores a 20 kHz para

satisfazer o critério de Nyquist — e ao elevado número de canais, com alguns sistemas incorporando mais de mil eletrodos (Siegle et al., 2017; Steinmetz et al., 2021). Em contraste, para registros de LFPs, cujas oscilações se concentram majoritariamente abaixo de 300 Hz, a taxa de amostragem necessária é mais de 10 vezes menor, e o número de eletrodos é limitado por propriedades físicas e pela própria anatomia, o que possibilita uma redução significativa nos custos dos componentes de registro.

Sistemas de aquisição de dados para eletrofisiologia geralmente incluem uma etapa de amplificação, um conversor analógico-digital (ADC, do inglês *analog-to-digital converter*), uma interface para coleta dos sinais digitais e um computador para configuração e armazenamento dos dados (Newman et al., 2013; Siegle et al., 2017; Uktveris & Jusas, 2018). No entanto, o alto custo desses sistemas e a necessidade de espaço físico dedicado limitam sua utilização, especialmente em experimentos paralelos e protocolos de longa duração, como por exemplo estudos longitudinais relacionados à epileptogênese.

Para superar esses desafios, propomos o MicroMAP — Micro Multichannel Acquisition Pack, um sistema portátil de baixo custo, projetado para registros contínuos e longitudinais de LFPs. Ao integrar componentes miniaturizados como computadores Raspberry Pi (RPI) e controladores Arduino, o MicroMAP oferece uma solução versátil e eficiente em termos de espaço, capaz de registrar até 32 canais com taxa de amostragem de 2kHz, tornando-se acessível a uma ampla gama de configurações experimentais. O MicroMAP também inclui uma solução para a construção de implantes com múltiplos eletrodos/múltiplas regiões de baixo custo, que auxilia na padronização de experimentos e na redução do tempo cirúrgico, sem comprometer a precisão da localização dos eletrodos ou a segurança do animal.

O projeto do MicroMAP foi inicialmente focado na integração de chipsets com estágios ADC da família Intan RHD2000 ou da série ADS129x, da Texas Instruments (Intan Technologies, 2023; Texas Instruments Incorporated, 2023). No entanto, desenvolvemos o sistema para ser modular e adaptável, permitindo a incorporação de outros conversores analógico-digitais. A utilização de placas Arduino na aquisição de sinais desempenha um papel fundamental,

pois permite a programação personalizada para interface com o ADC escolhido. Além disso, essa arquitetura preserva todas as funcionalidades do controlador Arduino, incluindo a capacidade de receber entradas de dispositivos externos.

Portanto, este trabalho apresenta um sistema completo de aquisição eletrofisiológica de baixo custo, detalhando seu processo de construção desde a interface gráfica (GUI, do inglês *Graphical User Interface*) do usuário e a lógica de controle da aquisição, até o projeto do estágio de conversão adaptado, compatível com os chipsets Intan RHD2000 e ADS1298, bem como a estratégia de montagem para matrizes de eletrodos de múltiplas regiões.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Projetar um sistema de aquisição de sinais eletrofisiológicos de baixo custo, que possa ser uma plataforma para a realização de experimentos focados em registro de potenciais de campo local em múltiplas regiões cerebrais. Neste projeto incluem não somente o equipamento para a coleta de amostras digitalizadas e sua respectiva interface, mas também todos os componentes necessários à execução de protocolos experimentais de eletrofisiologia, como a construção de implantes, esquemáticos para a produção dos estágios de conversão analógico-digital e as conexões necessárias ao funcionamento do sistema.

2.2. Específico

Os objetivos específicos são:

- Idealizar um sistema de registro de amostras digitalizadas que possa ser compatível com chipsets da família Intan RHD2000 ou da série ADS 129x da Texas Instruments.
- Produzir uma interface gráfica de usuário, que possa ser utilizada para a gestão e configuração dos registros eletrofisiológicos.
- Produzir uma placa de circuito impresso para acoplar o chipset ADS 1298, que representa o estágio de conversão analógico-digital.
- Simplificar o processo de montagem de matrizes de eletrodos de registro de múltiplas regiões cerebrais, que possua compatibilidade com os estágios de conversão analógico-digital.
- Apresentar o esquema de montagem do sistema para a execução de experimentos de eletrofisiologia.

3. METODOLOGIA

3.1. Códigos da interface gráfica e de controle da aquisição de sinais digitais

Assim como em outros sistemas de aquisição de sinais digitais, o MicroMAP é composto por três componentes principais: (1) uma interface gráfica executada por um computador (idealmente um Raspberry Pi), (2) uma rotina responsável pelo gerenciamento e comando do microcontrolador para a aquisição dos sinais digitais provenientes do ADC e (3) o próprio conversor analógico-digital (RHD2000 ou ADS1298), conforme ilustrado na Figura 23A.

O programa responsável pela interface gráfica foi desenvolvido em Python 3.12 com a biblioteca PyQt5, e auxilia o usuário ao longo de todo o processo de coleta de dados experimentais. A GUI inclui uma aba de configuração, apresentada na Figura 23B, onde o usuário pode escolher o modelo do ADC, definir a duração do experimento, ajustar as frequências de corte dos filtros passa-altas e passa-baixas (quando disponíveis), configurar a taxa de amostragem, selecionar os canais de interesse e escolher a porta USB vinculada ao microcontrolador.

O processo de aquisição de dados se inicia com um teste de integridade do sistema, que ao ser validado direciona o usuário para a aba de visualização dos sinais eletrofisiológicos (Figura 23C). Essa aba exibe em tempo real os sinais registrados pelo ADC, fornecendo ao experimentador uma visão geral da qualidade dos dados, juntamente com um resumo das configurações selecionadas. Nela também, o usuário pode selecionar um diretório para armazenar o conteúdo registrado e iniciar a gravação dos sinais eletrofisiológicos.

A interface gráfica também permite a configuração manual do ADC por meio da opção “Configurações Avançadas”, desde que esta seja ativada antes do início da gravação. A aba avançada exige conhecimento prévio dos registradores do circuito integrado utilizado (RHD ou ADS) e dos comandos de configuração correspondentes. No entanto, com a compreensão adequada do sistema, o usuário pode configurar diretamente os registradores do ADC, definir

a duração da gravação e modificar atributos da interface, como os temporizadores de exibição e salvamento.

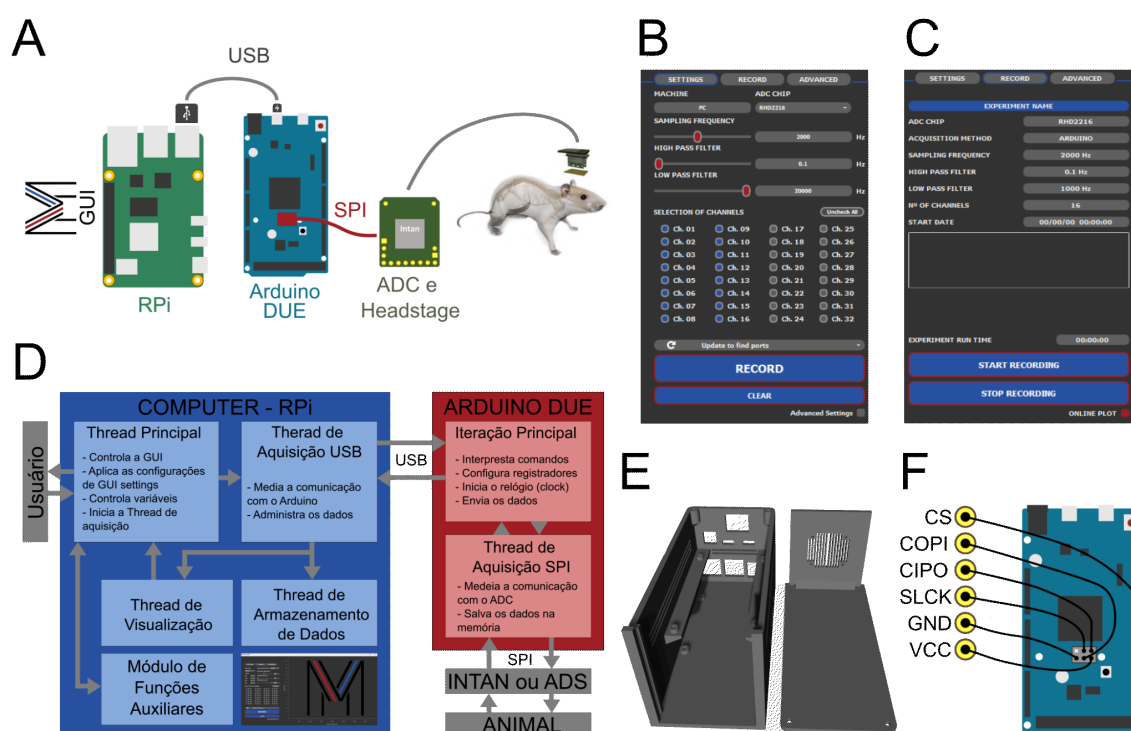


Figura 23 - Visão geral do sistema MicroMAP.

(A) Diagrama ilustrando a conexão entre os componentes do sistema. (B) Aba de configuração para inicialização das gravações eletrofisiológicas na interface do usuário. (C) Aba que exibe o status das gravações eletrofisiológicas na interface do usuário. (D) Fluxograma do funcionamento do sistema. (E) Modelo 3D da estrutura de encapsulamento. (F) Sistema de conexões para comunicação SPI entre o *headstage* e o Arduino Due.

Entretanto, por de trás da GUI existe uma rotina que atua como *back-end* do sistema, conforme mostrado pela Figura 23D. Ela é responsável por fazer a ponte entre o usuário e o microcontrolador Arduino Due, que se comunica diretamente com o ADC. O programa desempenha três funções principais no processo de aquisição de sinais: (1) registrar as preferências do usuário, (2) gerenciar o armazenamento dos dados e (3) disparar as ações do microcontrolador. Essas funções são coordenadas por quatro *threads* distintas de execução (implementadas como *pseudo-threads* em Python), representadas pelas caixas azul-claro na Figura 23D e enumeradas a seguir: (1) execução da interface, (2) aquisição de dados do microcontrolador, (3) exibição dos dados eletrofisiológicos e (4) gravação dos registros.

A thread (1) executa a interface (*front-end*), gerencia a interação do usuário, manipula variáveis de ambiente e envia as opções selecionadas ao Arduino Due por meio de um protocolo de comunicação simples, baseado em mensagens de 16 bits interpretadas por instruções condicionais *switch case* (por exemplo, o comando 0xE5000002 ativa o modo de teste de dados, enquanto 0xE5000001 o desativa e restaura a gravação normal do ADC). Ela também é responsável por inicializar a thread (2), que ativa os registradores do ADC, adquire dados do microcontrolador e aciona as threads (3) e (4), assim que os dados se tornam disponíveis.

Completando a cadeia de execução, a thread (3) processa os bytes recebidos e devolve os dados à primeira thread para sua representação gráfica na área de exibição, enquanto a thread (4) realiza a escrita dos dados em um arquivo binário. Ainda, o sistema inclui uma rotina dedicada para funções auxiliares e classes.

O microcontrolador — programado em C++ e representado pelo retângulo vermelho na Figura 23D — é responsável pelo controle direto e pela configuração dos registradores do ADC, funcionando como componente central da arquitetura do sistema. Embora a redução de custos seja parcialmente alcançada por meio do uso de plataformas computacionais acessíveis, como o Raspberry Pi (que executa a GUI em *hardware* de baixo custo), a economia mais significativa resulta da substituição dos sistemas convencionais de controle por um microcontrolador Arduino (CPU Atmel SAM3X8E ARM Cortex-M3). Isso ocorre pois, os sistemas comuns, tipicamente baseados em FPGAs (do inglês *Field Programmable Gate Array*), podem custar quase três vezes mais do que o sistema MicroMAP completo (Raspberry Pi, Arduino e Intan combinados; Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação dos custos dos componentes necessários para a construção do sistema MicroMAP e dos componentes utilizados em outros sistemas de aquisição (atualizado em 29/04/2025).

Component	Brand	Model	Price (\$)	Site
-----------	-------	-------	------------	------

Raspberry Pi	Raspberry Pi	B+	35.00	https://www.adafruit.com/product/3775?src=raspberrypi
Arduino	Arduino	Due	48.40	https://store-usa.arduino.cc/products/arduino-due?srslid=AfmBOooOVgZwkhxoNnKld5g3FDlxYfAPRwnQJ_QOKgxx1BiHzbW3mi
FPGA	Opal Kelly	XEM6310 LX45	1299.95	https://opalkelly.com/products/xem6310/?srslid=AfmBOorkl617n78mOYbuk1sR3hjXb2bk-k-exkS26gWT6a6KUCJ8Pr6s
FPGA	Opal Kelly	XEM6010 LX45	1049.95	https://opalkelly.com/products/xem6010/?srslid=AfmBOorxVF7hwU34DROIrTVHdM_CKMWIsINS13F5mLjL22O4iuch-fh
RHD	Intan	2132	127.00 - 430.00	https://intantech.com/pricing.html?tabSelect=RHDChips&yPos=0
RHD	Intan	2216	86.00 - 286.00	https://intantech.com/pricing.html?tabSelect=RHDChips&yPos=0
ADS	Texas Instruments	1298	21.80 - 333.59	https://www.ti.com/product/ADS1298/part-details/ADS1298IPAG

Embora essa substituição limite a capacidade do sistema para aquisição de dados em altas taxas de amostragem — restringindo a amostragem confiável a 2 kHz em no máximo 32 canais —, ela permanece alinhada com as aplicações pretendidas pelo MicroMAP, oferecendo uma solução robusta e acessível para registros prolongados de EEG. É importante destacar que a escolha do modelo do Arduino não foi arbitrária: o modelo Due foi selecionado por oferecer a interface SPI e as taxas de *clock* mais adequadas, compatíveis com as frequências de amostragem requeridas e com as especificações temporais dos chipsets RHD e ADS (Intan Technologies, 2023; Texas Instruments Incorporated, 2023).

Na família de ADCs RHD2000, a interface gráfica traduz os parâmetros de configuração selecionados pelo experimentador em comandos apropriados para os registradores do ADC e configura os temporizadores internos do Arduino para estabelecer a frequência de amostragem desejada. Esses temporizadores atuam como gatilhos periódicos, acionando uma *thread* de execução responsável por adquirir os sinais digitalizados via comunicação SPI (do inglês *Serial Peripheral Interface*). Esse protocolo utiliza quatro linhas de sinal: SCLK (do inglês *clock serial*), CS (do inglês *chip select*), CIPO (do inglês *controller in, peripheral out*) e PICO (do inglês *controller out, peripheral in*), conforme ilustrado na Figura 24.

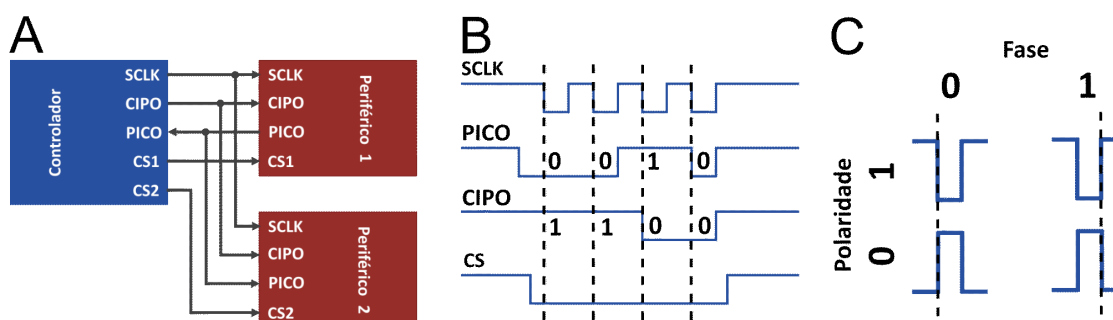


Figura 24 - Comunicação SPI.

(A) Diagrama ilustrando as linhas de comunicação SPI entre um controlador e dois periféricos, cada um ativado por uma linha de seleção de chip (CS) distinta. (B) Exemplo de troca de mensagem de 4 bits utilizando fase de clock 1 e polaridade 0. (C) Tabela resumindo as possíveis configurações de fase e polaridade do protocolo SPI.

A comunicação segue um protocolo SPI de 16 bits por canal, com fase e polaridade do *clock* definidas como zero. A aquisição dos dados ocorre de forma sequencial, um canal por vez, durante cada estado baixo da linha CS. O RHD converte e responde os comandos de conversão emitidos pelo controlador após dois ciclos de comunicação (dois pulsos da linha CS). Conseqüentemente, o sistema conclui a transferência completa de dados nos dois ciclos de CS subsequentes, ao coletar os dados remanescentes dos dois últimos canais solicitados, conforme mostrado na Figura 25A (Intan Technologies, 2023). A cada instante determinado pela frequência de amostragem, o Arduino insere no início de cada pacote de amostras (todos os canais) um cabeçalho de 16 bits representando um contador, com o objetivo de aumentar a confiabilidade do sistema e permitir a validação dos dados.

Em contraste, a família de chipsets ADS emprega um esquema de comunicação SPI diferente, embora mantenha a mesma fase e polaridade de *clock*. Nesse caso, o ADS transmite todos os dados dos canais para o Arduino em um único pacote a cada ciclo da linha CS. Diferente do RHD, o próprio ADC controla a frequência de amostragem, enviando um sinal de disparo para o Arduino sempre que os dados estão preparados para leitura. Por exemplo, a leitura de dados de oito canais envolve uma transmissão de 216 bits — composta por 24 bits de cabeçalho seguidos por 24 bits para cada um dos oito canais, conforme ilustrado na Figura 25B (Texas Instruments Incorporated, 2023).

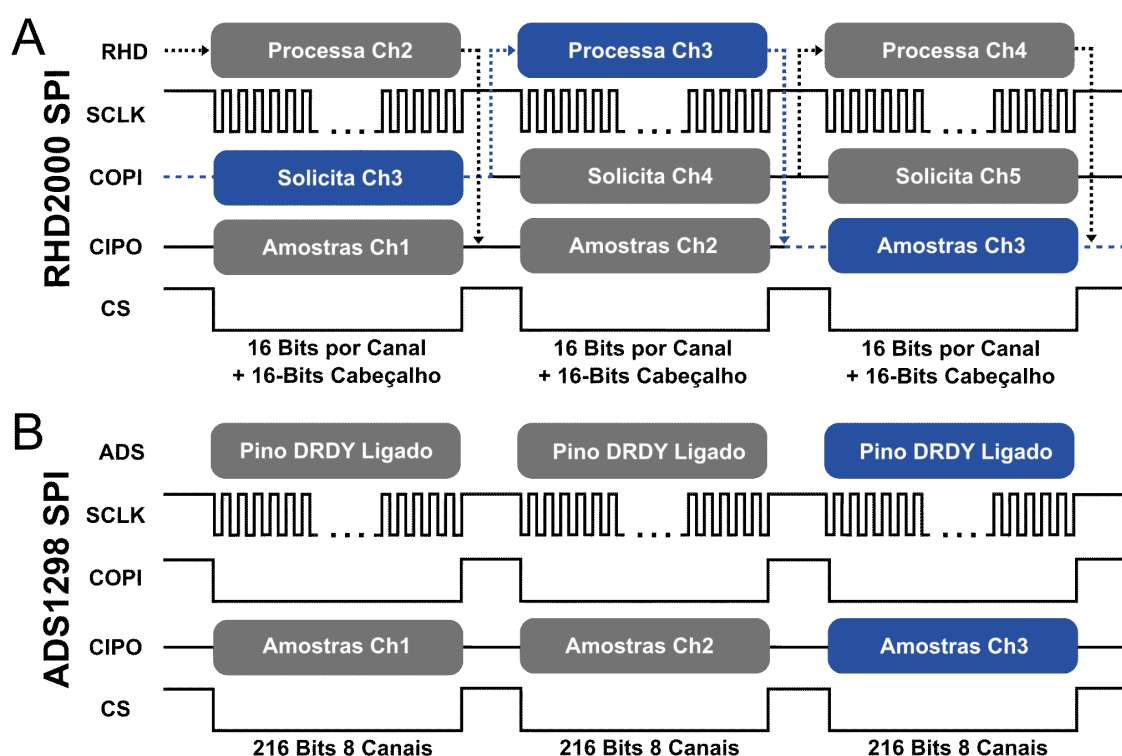


Figura 25 - Comunicação SPI dos chipsets RHD e ADS.

(A) Protocolo de comunicação SPI utilizado pelo RHD2000: cada pulso de CS inicia uma troca de mensagem de 16 bits, e o resultado da conversão de um determinado canal é retornado após dois pulsos de CS subsequentes. (B) Comunicação SPI do ADS1298 em modo single-shot, conforme implementado no MicroMAP: a cada pulso de CS, se o pino DRDY estiver em nível alto, ocorre uma troca de mensagem de 216 bits — composta por 24 bits de status seguidos por 24 bits por canal, totalizando oito canais.

A resposta recebida pelo Arduino na linha CIPO é armazenada em uma memória intermediária circular (comumente chamada de *buffer*), sendo cada entrada composta por um número pré-definido de bits que representam uma amostra. O microcontrolador transmite os dados para o computador hospedeiro por meio de comunicação serial (USB, do inglês *Universal Serial Bus*), com taxa de 50 MB/s. No computador, os dados recebidos são armazenados em *buffers* e encaminhados para as *threads* de exibição (3) e gravação (4), responsáveis pela visualização em tempo real e pelo armazenamento em arquivo.

Dois parâmetros importantes controlam os intervalos de atualização para a exibição gráfica e a gravação dos dados. Por padrão, ambos os intervalos são definidos em cinco segundos, ou seja, o gráfico é atualizado a cada 5 segundos, enquanto o buffer de dados é armazenado no arquivo binário

também a cada 5 segundos. O ajuste desses valores pode melhorar ou reduzir o desempenho das tarefas de visualização e salvamento.

Também é importante observar que, durante cada ciclo de comunicação SPI, o algoritmo desativa temporariamente todas as interrupções no Arduino para evitar interferências no processo de aquisição. Após a aquisição ser concluída corretamente, as interrupções são reativadas, permitindo que o microcontrolador execute tarefas auxiliares, como a transmissão dos dados via USB ou a resposta a comandos adicionais do sistema.

A rotina de execução do *software* se encerra com a decodificação dos dados recebidos no computador hospedeiro e o armazenamento em um formato binário personalizado, desenvolvido de acordo com as especificações do sistema MicroMAP.

3.2. Construção dos headstages adaptados para os chipsets RHD e ADS

Em um estudo anterior realizado no NNC, foi desenvolvido um sistema de estágio de conversão analógico-digital de baixo custo, equipado com *chipsets* Intan RHD2000. Comumente chamado estágio de cabeça (ou, em inglês, *headstage*), o aparelho fornece suporte ao conversor analógico-digital, contatos para comunicação SPI e conectores achatados SMD/FPC de 20 vias para a conexão dos canais fixados na cabeça do animal. Ainda, no mesmo trabalho, foi proposta uma metodologia de construção de matrizes de eletrodos também de baixo custo, para integrar e compatibilizar com o design do *headstage* desenvolvido (Mourão et al., 2022). A Figura 26A mostra o design da placa de circuito impresso desenvolvida para chipsets da família RHD2000.

Os métodos enunciados pelo artigo possibilitaram registros multicanal de alta qualidade em animais livres para se locomover, permitindo a captação de potenciais de campo local, respostas evocadas e até a atividade de unidades neuronais isoladas, ao mesmo tempo em que garantia estabilidade mecânica para uso em experimentos prolongados (Mourão et al., 2022).

A adaptação apresentada modificou o design comercial comumente vertical, como exemplificado pela Figura 26B, para uma configuração horizontal, de forma a reduzir o torque aplicado à cabeça do animal durante os

registros. Além disso, as conexões SMD/FPC substituíram os conectores Omnetics, reduzindo significativamente o custo total do *headstage*. As setas na Figura 26B indicam os conectores Omnetics, enquanto a Figura 26C exemplifica os conectores SMD/FPC e como são soldados na placa de circuito impresso.

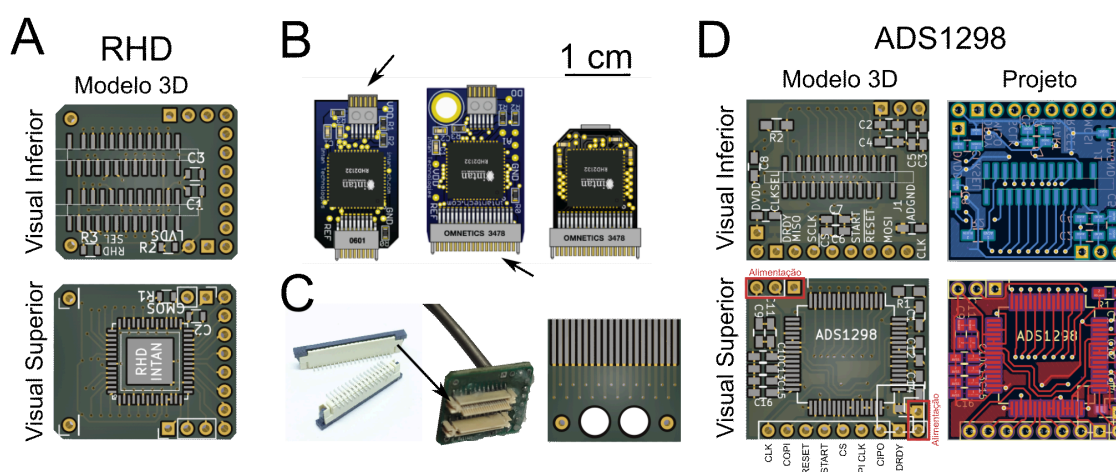


Figura 26 - Circuito do *headstage* para *chipsets* da série ADS 129x.

(A) Renderização das duas faces da placa de circuito impresso do *headstage* para *chipsets* da família Intan RHD2000. (B) Design de *headstages* comerciais da Intan (figura extraída no endereço <https://open-ephys.org/headstages> da Open Ephys no dia 17/06/2025). Os três exemplos são verticais em relação ao crânio do animal e possuem conectores Omnetics (setas). (C) À esquerda estão o exemplo de conector achatado SMD/FPC e sua disposição em um *headstage* para *chipsets* da família Intan RHD2000. À direita está mostrado o adaptador que conecta os eletrodos de registro aos canais do conector SMD/FPC. (D) Renderização e projeto do circuito (KiCAD 8) das duas faces da placa de circuito impresso do *headstage* para *chipsets* da série ADS 129x da Texas Instruments.

Portanto, a construção do MicroMAP foi pensada para agregar os métodos descritos anteriormente, podendo o sistema ser compatível não somente a conectores e *headstages* comerciais, mas também às soluções de baixo custo desenvolvidas previamente pelo próprio laboratório. Na Seção 3.2 do Capítulo I do presente trabalho, foi descrita a adaptação metodológica aplicada à construção de matrizes e abaixo segue a descrição do desenvolvimento do *headstage* horizontal adaptado que integra o chipset ADS1298 ao sistema MicroMAP, que é representado pelo desenho esquemático exposto na Figura 26D.

O componente consiste em uma placa de circuito impresso, projetada no KiCAD 8, que conecta o canal de registro ao ADS1298 e direciona o sinal

digital convertido para uma plataforma de comunicação SPI. Além dos contatos típicos das vias do SPI, a PCB também abriga outras conexões essenciais, incluindo: o pino RESET para configuração do chipset; DRDY (*data ready*) para acionar a leitura de dados; START para iniciar a gravação; e as linhas de alimentação.

De maneira análoga ao *headstage* adaptado da série RHD introduzido anteriormente, foram utilizados conectores achatados SMD/FPC de 20 vias para fornecer uma interface confiável e econômica entre o implante contendo os eletrodos de registro e o sistema de aquisição. Cada conector suporta 16 canais, além das linhas de terra e referência posicionadas nas bordas. Para aumentar a robustez, todas as conexões são espelhadas na face oposta da PCB, fornecendo caminhos elétricos redundantes. Dessa forma, o ADS1298 utiliza 16 eletrodos configurados em pares diferenciais para formar os oito canais bipolares de registro. A Figura 26C também ilustra o conector e sua interface correspondente, implementada como uma PCB de dupla face com trilhas dedicadas e furos passantes para soldagem dos eletrodos.

3.3. Design e fabricação da caixa para o MicroMAP

Para padronizar e proteger os componentes centrais do sistema, foi projetada uma carcaça de 140 mm × 65 mm × 67 mm utilizando o software SketchUp. A fabricação foi feita em plástico PLA (3D Lab) com uma impressora 3D FlashForge Creator Pro por meio do modelo mostrado na Figura 23E. A estrutura acomoda tanto o Arduino Due quanto o Raspberry Pi (Figura 27A e 26B); no entanto, qualquer outro computador pode substituir o Raspberry Pi por meio de uma conexão USB com o Arduino.

Para a conexão dos *headstages*, RHD ou ADS, ao Sistema do MicroMAP foi desenvolvido um esquema com conectores RJ45, no qual um soquete foi acoplado à carcaça e conectado aos pinos do Arduino, conforme a Figura 23E, enquanto outro foi soldado aos contatos do headstage por meio de um cabo comutador, conforme a Figura 27C. A conexão, então, é feita por uma extensão com dois plugues nas extremidades, entretanto, não é imperativo o uso desse esquema de cabos, podendo ser utilizado somente uma interface RJ45 diretamente conectada ou, até mesmo, outros tipos de conectores. Por

fim, também foi instalada, junto à carcaça, uma ventoinha para resfriamento dos equipamentos.

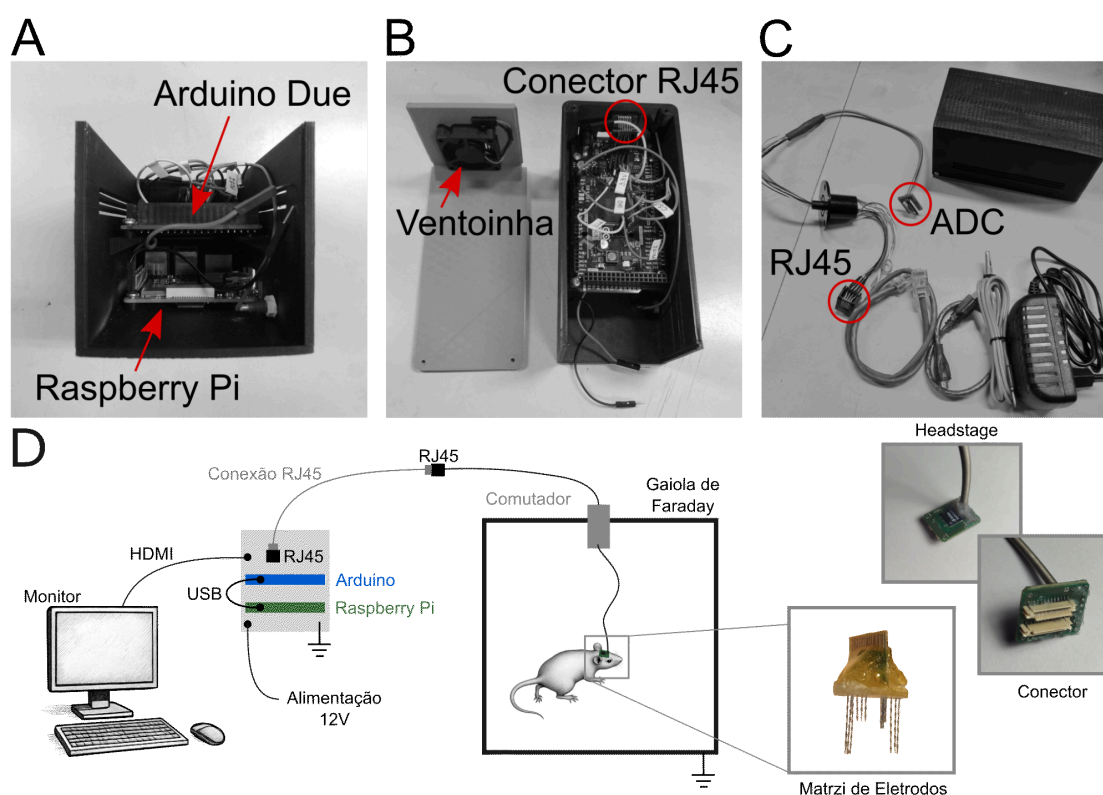


Figura 27 - Estrutura do MicroMAP.

(A) Carcaça do MicroMAP juntamente com todos os cabos necessários para o funcionamento do sistema. Da esquerda para a direita: o conector do headstage com comutador, uma extensão com conexão RJ45, o cabo USB, o fio de aterramento e a fonte de alimentação de 12V. (B) Visão interna da carcaça, onde o Arduino Due está montado sobre o Raspberry Pi. (C) Componentes individuais da carcaça, incluindo uma visão detalhada das conexões do Arduino e das linhas de sinal que se conectam ao conector RJ45. (D) Montagem de um experimento *in vivo* utilizando o MicroMAP. Em cinza está a carcaça do MicroMAP que contém o Arduino em azul e o Raspberry Pi em verde. Por meio de conexões RJ45, o sistema é conectado ao *headstage*, que é mostrado à direita na imagem, juntamente com o conector e um exemplo de implante.

A Figura 26C mostra todos os componentes necessários ao registro eletrofisiológico, exceto a matriz de eletrodos a ser implantada no animal experimental. Destacados em vermelho estão o headstage (no exemplo um *headstage* contendo um *chipset* RHD 2132) conectado ao soquete RJ45 por um comutador. À esquerda do cabo do *headstage* estão, respectivamente, a extensão com dois plugues RJ45, uma cabo USB para conectar o Arduino ao

Raspberry Pi, um cabo de aterramento para ser conectado à carcaça e a fonte 12V para alimentar o sistema.

O desenho esquemático de conexão está representado pela Figura 27D, note que, neste caso, foi adicionado um monitor conectado por HDMI ao Raspberry Pi. Entretanto, é importante enfatizar que esses microcomputadores possuem um sistema de espelhamento de tela proprietário e podem ser acessados de outros computadores através do sistema Raspberry Pi Connect.

3.4. Validação das funcionalidades do controlador

Em cada etapa do desenvolvimento da interface, utilizou-se a aba de configurações avançadas da GUI para testar a comunicação SPI, enviando mensagens para leitura dos registradores dos chips RHD2132 e ADS1298. As respostas foram então comparadas com os valores esperados descritos nos respectivos manuais dos circuitos integrados (Intan Technologies, 2023; Texas Instruments Incorporated, 2023).

Para validar a capacidade do sistema de registrar dados sem perda de pacotes, o algoritmo do microcontrolador foi testado utilizando um sinal simulado gerado pelo próprio Arduino. Cada canal foi configurado para registrar uma onda dente de serra oscilando entre valores negativos e positivos de magnitude diretamente proporcional ao número do canal, como mostrado na Figura 28. Além disso, as amostras foram escritas em formato big-endian, simulando o comportamento dos ADCs, para validar a decodificação dos dados implementada na GUI.

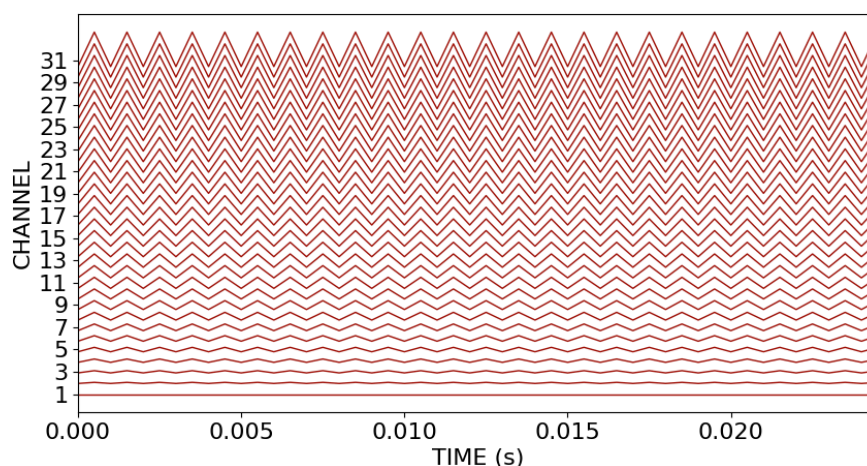


Figura 28 - Sinal dente de serra gerado pelo Arduino e registrado pelo MicroMAP para testar a comunicação entre os componentes (a amplitude é desprezível).

Tabela 4 - Características dos registros coletados.

Tipo	OE	RPI	PC	Frequência de		Ch.	Duração (s)
				amostragem	Filtro (Hz)		
				(kHz)			
Amostra		2x	2x	2	-	32	1800
Amostra		2x	2x	2	-	32	900
Amostra		2x	2x	2	-	32	600
Amostra		2x	2x	2	-	32	300
EKG	1x	1x		2	2 - 2000	32	1800
EKG	1x	1x	1x	2	0.1 - 2000	32	600
EKG	1x	1x	1x	1	10 - 1000	32	120
EKG	1x	1x	1x	1	5 - 200	32	120
EKG	1x	1x	1x	1	2- 500	32	120

Os registros deste teste foram realizados com diferentes durações utilizando 32 canais a uma frequência de amostragem de 2kHz, com o objetivo de verificar a integridade e o tamanho dos arquivos salvos. A descrição de cada configuração testada está mostrada na Tabela 4, sob o rótulo “Amostra”. Ainda, foi utilizada a aba de configurações avançadas da interface para configurar um temporizador que finalizou automaticamente cada registro. Por fim, para garantir ainda mais a confiabilidade dos dados, desenvolveu-se um código de verificação, com o objetivo de monitorar perdas de amostras e detectar inconsistências no padrão da onda dente de serra, por meio do cálculo

da correlação de Spearman entre o sinal registrado e a própria simulação esperada.

3.5. Registro bioelétrico e validação do headstage adaptado RHD2000 utilizando o micromap

Com o objetivo de comparar a qualidade de sinais obtidos pelo sistema MicroMAP em relação a registros feitos pelo Open Ephys, executou-se um protocolo de eletrocardiograma (EKG), que foi conduzido em um rato Wistar macho com aproximadamente 280 g. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG: 57/2025) e seguiram as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a legislação federal brasileira vigente.

O protocolo de EKG foi escolhido devido à natureza estereotipada do sinal cardíaco e pela possibilidade de se adquirir simultaneamente o mesmo sinal em ambos os sistemas de registro, como mostrado pela Figura 29A, que ilustra o arranjo experimental. O rato foi anestesiado por via intraperitoneal com uma solução de uretana a 28%, na dose de 0,01 mL/g, e posicionado em decúbito dorsal dentro de uma caixa acrílica de 30 mm × 30 mm × 30 mm, inserida em uma gaiola de Faraday.

O animal foi conectado a dois *headstages* equipados com Intan RHD2132: um vinculado ao sistema Open Ephys e outro ao MicroMAP, conforme mostrado à direita na Figura 29A. Três agulhas G30 foram inseridas no tecido subcutâneo do animal para garantir o contato adequado para o registro do EKG. Em sistema de aquisição, fios soldados a garras tipo jacaré foram ligados a uma PCB compatível com os conectores SMD/FPC do *headstage*, o qual, por sua vez, foi conectado ao respectivo equipamento de gravação.

Dezesseis canais foram interligados a um único eletrodo enquanto os outros dezesseis foram deixados abertos. Já os canais de referência e aterramento foram conectados aos dois eletrodos remanescentes, conforme apresentado na Figura 29A. Para validar múltiplas configurações do MicroMAP, foram realizados quatro registros distintos de EKG, conforme detalhado na

Tabela 4 sob a etiqueta “EKG”. Cada configuração variou parâmetros de registro, incluindo o dispositivo utilizado para a execução da GUI (um computador pessoal com processador Intel i5-1135G7 e 8 GB de RAM ou um Raspberry Pi Modelo 3B+), a frequência de amostragem, a largura de banda do filtro do ADC e a duração da gravação.

Após a fase de aquisição dos sinais eletrofisiológicos, os dados passaram pela mesma rotina de análise. Primeiramente, foram filtrados por filtros de rejeição de faixa em 60 Hz e 120 Hz e, posteriormente, por um filtro passa-faixa de 1 Hz a 300 Hz. Em seguida, as gravações do MicroMAP e do Open Ephys foram sincronizadas por meio de correspondência de padrões, implementado com a biblioteca STUMPY (Law, 2019). Uma vez que os sinais foram devidamente alinhados, calculou-se os coeficientes de correlação de Pearson entre os canais válidos.

A integridade dos dados do sistema MicroMAP foi avaliada pela comparação entre o tamanho de arquivo efetivamente armazenado, em bytes, e o tamanho esperado, calculado com base na duração da aquisição, no número de canais e na frequência de amostragem. Também foi identificado o número de amostras perdidas.

3.6. VALIDAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DO HEADSTAGE ADAPTADO PARA O ADS1298

Para validar o *headstage* equipado com *chipsets* ADS e selecionar os componentes eletrônicos apropriados, uma versão de teste do circuito foi projetada ampliando o layout do circuito impresso original e transferindo-o para uma placa de circuito impresso (PCI) de face simples, como mostrado na Figura 30A.

Tabela 5 - Configuração de capacitores e resistores do ADS1298 (design disponível no GitHub).

Qty.	Capacitância	Qty.	Capacitância
1	100pF	1	10uF
1	1nF	1	33uF
5	0.1uF		
6	1uF		
		Qty.	Resistência
		2	1MΩ

Após a determinação dos valores ideais de resistores e capacitores, conforme a Tabela 5 o *headstage* adaptado do ADS1298 foi validado por meio

de seus sinais internos de teste, sob duas configurações predefinidas: ondas quadradas de 1 Hz e 2 Hz, com amplitude de 6,6 mV pico a pico, geradas com alimentação de 5 V e ganho de 12 vezes. A configuração foi definida por meio dos registradores 1 e 2 do ADC, e a aquisição de dados foi realizada com frequência de amostragem de 2 kHz.

3.7. Documentação

O repositório no GitHub fornece controle de versão e hospeda o código-fonte. Além disso, a documentação detalhada do sistema foi elaborada com a biblioteca Sphinx e está disponível na plataforma Read the Docs, com o objetivo de ampliar a acessibilidade e oferecer suporte à construção e utilização do MicroMAP.

3.8. Disponibilidade dos dados

Os códigos, modelos 3D, projetos de PCBs e a documentação que foram apresentados neste trabalho estão disponíveis em: <https://github.com/nnc-ufmg/micromap>.

4. RESULTADOS

A Figura 29B apresenta o registro válido de EKG em 16 canais adquirido com o MicroMAP. O sinal exibe a morfologia esperada do traçado eletrocardiográfico em um par de eletrodos, com amplitude aproximada de 1 mV e frequência em torno de sete batimentos por segundo (420 bpm) (Silver et al., 2021). A Figura 29C mostra uma comparação direta entre um sinal adquirido com os dois sistemas, Open Ephys em cinza e MicroMAP em vermelho. Além da semelhança visual evidente, o coeficiente médio de correlação de Spearman entre todos os canais registrados pelos dois sistemas foi de $0,944 \pm 0,055$ para as gravações realizadas com o Raspberry Pi, e de $0,975 \pm 0,023$ para aquelas realizadas com um computador.

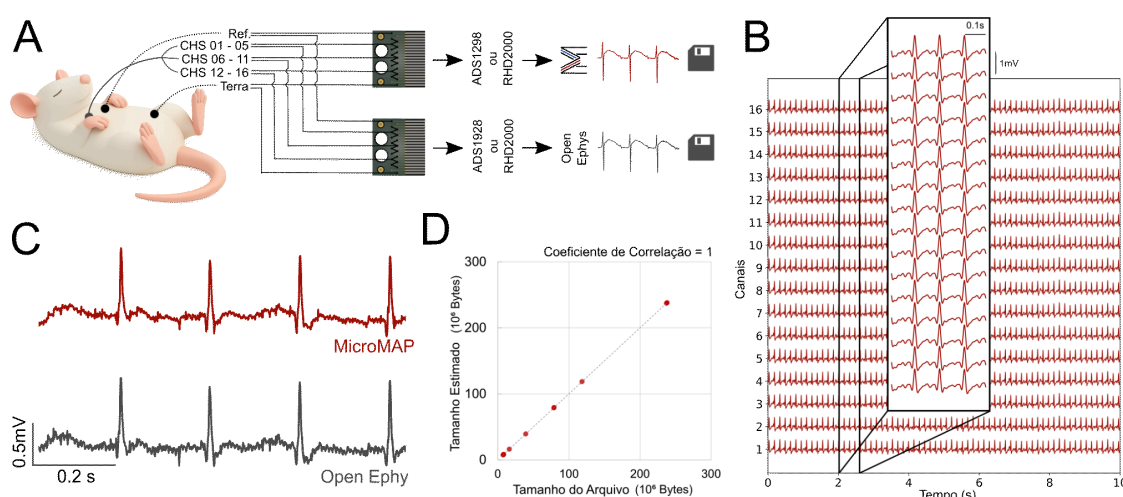


Figura 29 - Resultados experimentais utilizando o RHD2000.

(A) Visão geral do protocolo de EKG. (B) Eletrocardiograma de 16 canais registrados pelo MicroMAP. Os canais foram interligados (curto-circuito) para garantir que o sinal seja idêntico em todos os canais. A figura demonstra a capacidade de registro precisa dos 16 canais, e o painel apresenta uma visualização ampliada dos sinais. (C) Comparação entre o EKG registrado pelo MicroMAP (acima) e pelo Open Ephys (abaixo). (D) Relação entre os tamanhos de arquivo estimado e efetivamente armazenados pelo MicroMAP.

Importante destacar que nenhum pacote foi perdido durante a aquisição; no entanto, foi observado um desvio de *clock* entre o FPGA do Open Ephys e o Arduino Due, estimado em $(3,48 \pm 0,573) \times 10^{-5}$ amostra por amostra. Esse desvio corresponde, por exemplo, a um atraso de 39 amostras ao longo de uma gravação de 10 minutos com taxa de amostragem de 2 kHz. Os valores de

correlação relatados acima consideram essa discrepância de amostragem entre os sistemas.

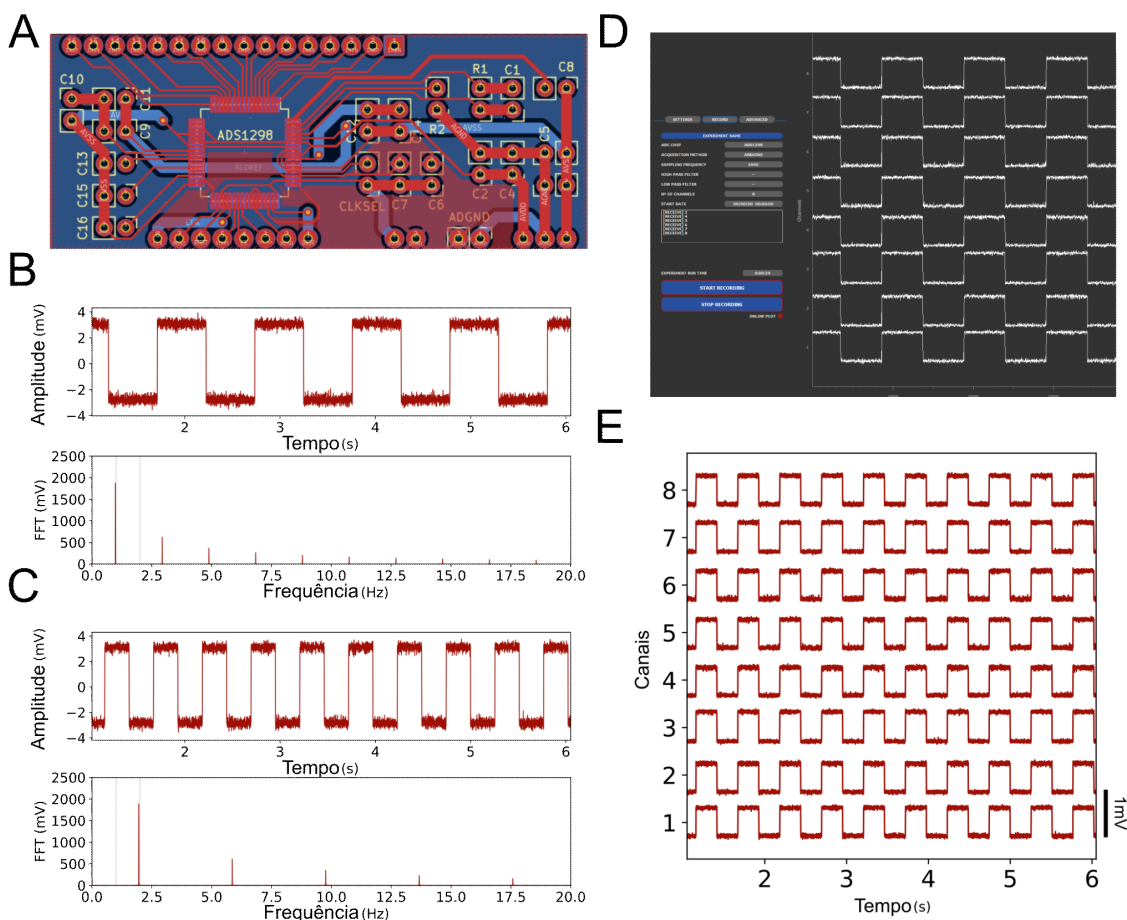


Figura 30 - Validação do *headstage* e da aquisição de sinais de *chipsets* ADS1298.

(A) Projeto da placa *breadboard* do ADS1298 para testes do conversor ADC com o sistema MicroMAP. (B) Onda quadrada de 1 Hz registrada com taxa de amostragem de 2 kHz. (C) Onda quadrada de 2 Hz registrada com taxa de amostragem de 2 kHz. (D) Aquisição do sinal do ADS1298 por meio da interface gráfica do MicroMAP. (E) Sinal de teste de 1 Hz observado em todos os canais registrados, com amostragem a 2 kHz.

Em todos os experimentos realizados com o MicroMAP e o Intan RHD2132, foi obtido um coeficiente de correlação de Pearson igual a 1,0 entre o tamanho de arquivo estimado e o tamanho real, conforme mostrado na Figura 29D. Os achados confirmam que a taxa de amostragem é precisa e que o MicroMAP é capaz de registrar os dados sem perda significativa de amostras. Esse resultado foi reforçado pela análise do contador de pacotes presente nos cabeçalhos de cada amostra, revelando que durante a aquisição dos sinais

dente de serra simulados pelo Arduino, apenas 8 amostras foram perdidas dentre as 32.401.699 registradas em todas as aquisições.

Para cada perda detectada, o algoritmo de leitura do MicroMAP substitui automaticamente o valor ausente pela amostra anterior, preservando a precisão temporal. Como a correlação de Pearson com o sinal dente de serra esperado permaneceu em 1,0, para todas as gravações, essa correção não teve impacto mensurável na integridade dos dados.

Por fim, o sinal quadrado de teste, emitido pelo *chipset* ADS1298 e registrado pelo MicroMAP, apresentou o comportamento esperado, confirmado pela precisão da frequência de pico nas configurações de 1 Hz e 2 Hz. Os sinais também exibiram a amplitude esperada de 3,3 V com ganho configurado em 12x, conforme mostrado na Figura 30B e 30C. Além disso, a Figura 30D expõe o funcionamento da interface gráfica durante a aquisição de sinais, enquanto a Figura 30E apresenta, com escala, os dados registrados em todos os canais.

5. DISCUSSÃO

A criação de um sistema de aquisição de registro eletrofisiológico portátil, financeiramente viável e versátil exige uma capacidade inovadora para superar obstáculos como a adaptação de hardware, a comunicação entre sistemas, o design de software intuitivo e a abordagem de limitações inerentes ao processo de simplificação (Siegle et al., 2017; Uktveris & Jusas, 2018). Para o MicroMAP, o interesse em registros de LFP para estudar a integração de longo alcance e protocolos longitudinais, guiou o desenvolvimento criativo para mediar o comando e controle da aquisição de dados realizada pelos ADCs RHD ou ADS.

Foi necessário também criar e alterar metodologias para além do próprio sistema de aquisição. Portanto, a plataforma para a construção de implantes de eletrodos, bem como o desenvolvimento de *headstages* adaptados para ambos os ADCs, forneceram, junto com o MicroMAP, a possibilidade de se produzir todos os componentes importantes ao estudo de LFP em múltiplas regiões cerebrais. Desta forma, todo o processo de elaboração experimental pôde ser contemplado de maneira financeiramente viável.

Estudos baseados na visão tradicional da função cerebral, que enfatizam uma arquitetura modular onde regiões cerebrais específicas são responsáveis por funções cognitivas discretas (ou seja, anatomia funcional), não conseguem explicar totalmente a flexibilidade, a integração e as propriedades emergentes de processos cerebrais de ordem superior, como consciência, memória, tomada de decisão e regulação emocional (Bertolero et al., 2015; Hackel et al., 2016; König et al., 1996).

Essa abordagem tem se baseado fortemente em estudos comportamentais, no uso de biomarcadores neuronais de atividade, em protocolos de neuromodulação e em outros registros de dados mais relacionados ao estado do sistema do que à sua dinâmica temporal (Canto-de-Souza & Mattioli, 2016; Josselyn & Tonegawa, 2020; LeDoux, 2003; McHugh & Tonegawa, 2007). No entanto, avanços recentes destacam a importância da dinâmica neuronal — ou seja, o tempo, a coordenação e os padrões oscilatórios da atividade neural — na formação da integração em larga

escala no processamento de informações. Em vez de atuarem como processadores isolados, as regiões cerebrais operam como redes dinâmicas cujos papéis funcionais emergem de suas interações dependentes do contexto (Basu et al., 2016; Buzsáki, 2005; Buzsáki & Tingley, 2018; Cota et al., 2023; Stepan et al., 2012).

Este trabalho oferece uma solução de baixo custo implementável para registros eletrofisiológicos de múltiplas regiões em uma escala de tempo compatível com a integração da dinâmica neural com o comportamento. Em sua essência, o MicroMAP pode beneficiar vários laboratórios de biologia experimental, permitindo o registro de dados temporalmente coordenados, ritmos oscilatórios e a avaliação da atividade sincronizada entre populações neurais espacialmente distantes, permitindo a ligação, roteamento e filtragem de informações. Por exemplo, as interações hipocampo-corticais durante a consolidação da memória, ou o papel do córtex pré-frontal na função executiva, dependem criticamente das relações de fase e da sincronia da atividade neural e não apenas de quais áreas estão conectadas (Dahal et al., 2023; García et al., 2025; Reinhart, 2022).

Em suma, a compreensão da cognição de alto nível requer ir além de "onde" as coisas acontecem no cérebro, e avançar para "quando" e "como" elas acontecem — uma mudança da arquitetura estática para a computação dinâmica. Os registros eletrofisiológicos realizados simultaneamente em múltiplas áreas estão no centro da abordagem desse problema, e o MicroMAP visa introduzir essa técnica no arsenal de laboratório, de forma tão econômica, simples e viável quanto possível.

Os resultados das aquisições de EKG e dos registros de sinais de teste demonstraram que o MicroMAP pôde se comunicar de forma eficaz com os ADCs Intan RHD2132 e ADS1298, e por consequência, com demais *chipsets* da mesma família. Além disso, foi aprovada a capacidade do sistema em manter uma frequência de amostragem consistente, comparável a outros sistemas comerciais. Também foi validada a interface gráfica do usuário, confirmando que as configurações feitas pelo experimentador são corretamente transmitidas e que o armazenamento de dados é compatível com o número de amostras recebidas via comunicação serial. Juntos, esses resultados servem como ensaios de uma análise comparativa para avaliar a confiabilidade,

qualidade e outras características comumente abordadas por outros sistemas eletrofisiológicos.

No contexto do estudo das epilepsias, os LFPs são altamente empregados tanto em modelos animais quanto em humanos, seja por medições adquiridas pelo EEG de escalpo ou por iEEG (Buzsáki et al., 2012; Paz & Huguenard, 2015; Stead et al., 2010). Este trabalho apresentou, no Capítulo I, experimentos direcionados à elucidação da dinâmica ictogênica através de registros realizados por múltiplos eletrodos em múltiplas regiões. O MicroMAP seria totalmente capaz de realizar os mesmo registros, entretanto, não é está a única aplicação do sistema relacionado ao tema.

Apesar de sua estimada importância, estudos relacionados à janela que compreende o status epilepticus estão restritos à uma fase inicial e aguda da epilepsia e não abrangem o processo epileptogênico. Para tanto, seria necessário uma investigação longitudinal, com duração prolongada o suficiente para o registro das modificações ocorridas durante o desenvolvimento da epilepsia no cérebro. É nesse cenário que soluções miniaturizadas de baixo custo, como MicroMAP, podem ter um papel fundamental na viabilização do desenho experimental.

No modelo de ácido caínico, por exemplo, a epileptogênese ocorre em uma janela de aproximadamente 21 dias até o surgimento das primeiras crises espontâneas e recorrentes (Lévesque & Avoli, 2013; Rusina et al., 2021). É nesse período que modificações importantes acontecem nas circuitarias encefálicas, tornando patológico um cérebro antes saudável. Conseqüentemente, este estágio da doença fornece um alvo terapêutico interessante, tanto para intervenções farmacológicas, quanto para o desenvolvimento de técnicas de modulação neural, com o objetivo de suprimir ou reduzir os efeitos e a progressão da patologia (Pitkänen & Lukasiuk, 2011).

Para além da janela de desenvolvimento da epilepsia, é notável a importância de estudos relacionados aos processos ictais espontâneos e recorrentes (Krook-Magnuson et al., 2015). Uma melhor compreensão da dinâmica que os antecede pode ser crucial na aplicação de técnicas de circuitos de malha fechada que visam interromper ou atenuar a progressão ictal (Krook-Magnuson et al., 2013; Stieve et al., 2023). Tais métodos podem ter um papel fundamental na melhoria da qualidade de vida de pacientes,

principalmente aqueles farmacoresistentes, e também na diminuição dos efeitos colaterais progressivos decorrentes das crises epiléticas.

Portanto, é de se imaginar que pesquisadores podem se beneficiar de registros de LFPs contínuos em protocolos de longa duração para o estudo dos processos epileptogênicos e ictogênicos. Entretanto, desenhos experimentais longitudinais dessa natureza, geralmente tendem a ser onerosos e, até mesmo, fisicamente inviáveis, dado o tamanho de alguns sistemas comerciais de aquisição digital de sinais, principalmente aqueles mais tradicionais.

Neste contexto, o MicroMAP pode vir a ser uma poderosa ferramenta. Como cada sistema pode ser construído pelos próprios laboratórios, com peças em abundância no mercado a um preço factível, existe uma facilitação em termos da obtenção de múltiplos aparelhos de aquisição. Além disso, a miniaturização dos componentes utilizados, aliados à capacidade de transmissão e espelhamento de tela fornecida pelos Raspberry Pi, oferecem a possibilidade da alocação de múltiplos sistemas em paralelo em um espaço físico reduzido. Isso porque cada sistema pode ser anexado individualmente acima de cada gaiola de experimentação.

Além disso, as entradas e saídas de propósito geral tanto do Arduino como do Raspberry Pi representam uma perspectiva interessante à aplicações que exigem não somente o registo do LFP, mas também a sincronização de vários elementos como câmeras, estimuladores, aparelho de optogenética, entre outros. Ainda, a capacidade de processamento de ambos os componentes também fornece um arcabouço para tratamento de dados *in loco*, extremamente necessário à implementação de circuitos de malha fechada.

Entretanto, seguindo as práticas de engenharia de *software*, o aprimoramento do MicroMAP dependerá das experiências dos usuários e das necessidades experimentais. A estrutura de código aberto do MicroMAP estimula sua escalabilidade ao atrair colaboradores para aprimorar a redução de custos, a inovação, aplicações personalizadas, processamento de sinal em tempo real, compartilhamento remoto de dados e integração de diferentes sistemas de aquisição (ou seja, vídeo/comportamento, temperatura, desempenho de tarefas e outras variáveis fisiológicas). Essa abordagem garante o desenvolvimento contínuo em resposta às solicitações externas e incorpora adaptações feitas por terceiros via GitHub.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta o MicroMAP como uma solução de baixo custo, escalável e de código aberto para registros eletrofisiológicos, permitindo a aquisição, o gerenciamento e o armazenamento de dados neurais contínuos em múltiplas regiões cerebrais com infraestrutura mínima. Experimentos de validação confirmaram que o MicroMAP mantém a frequência de amostragem e a integridade dos dados, alcançando um desempenho comparável a sistemas comerciais estabelecidos, ao mesmo tempo em que permite a utilização de duas plataformas de ADC, RHD2000 e ADS129x. Ao combinar flexibilidade, acessibilidade e um modelo de desenvolvimento impulsionado pela comunidade, o MicroMAP oferece uma plataforma poderosa para expandir o estudo da dinâmica neural temporal e da integração de redes de longo alcance na neurociência de sistemas.

CAPÍTULO III

CircadiPy: Conjunto de Ferramentas de
Código Aberto para Análise de Séries
Temporais Rítmicas

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Cronobiologia é o campo científico dedicado à investigação da periodicidade em vários processos biológicos e comportamentais, com foco particular no ciclo circadiano. Este ciclo, um ritmo interno que se repete aproximadamente a cada 24 horas, desempenha um papel crucial na sincronização dos organismos, permitindo a sua antecipação diária imposta pelas demandas ambientais (Duffy & Dijk, 2002; Edgar et al., 1993; Moore-Ede et al., 1982).

O núcleo supraquiasmático (SCN, do inglês *suprachiasmatic nucleus*) do hipotálamo é considerado o marca-passo circadiano mestre em mamíferos (Colwell & Foster, 1992; Meijer & Rietveld, 1989) e os neurônios que o compõe exibem um ciclo de atividade intrínseco de aproximadamente 24 horas, coordenando e sincronizando vários ritmos fisiológicos no corpo. Essas oscilações, ou relógios circadianos, são geradas por alças de retroalimentação transcricional-translacional autorreguladoras dos chamados genes do relógio. Embora, a expressão rítmica dos genes do relógio tenha sido descrita em praticamente todos os tipos de células, incluindo aquelas fora do SCN, caracterizadas como relógios periféricos (Dardente et al., 2007).

O relógio circadiano regula uma variedade de processos cruciais, incluindo o metabolismo, a regulação da temperatura corporal, a atividade motora e o ciclo sono-vigília (Borbély et al., 1980; Huang et al., 2011). A perturbação desse delicado equilíbrio pode levar a graves consequências para a saúde. Pesquisas têm demonstrado que distúrbios no relógio circadiano estão fortemente ligados a um risco aumentado de doenças cardiovasculares (Bray et al., 2008; Chellappa et al., 2019; Peliciari-Garcia et al., 2016; Thosar et al., 2018; Young et al., 2014), distúrbios imunes (Shimba & Ikuta, 2020; Shivshankar et al., 2020) e alterações nos padrões metabólicos e hormonais frequentemente observados em condições como obesidade e diabetes (Pan et al., 2020; Serin & Acar Tek, 2019; Stenvers et al., 2019).

Para estudar e analisar os ritmos circadianos, frequentemente examina-se séries temporais de dados correlacionados, incluindo expressão gênica, atividade neuronal, temperatura corporal e atividade motora. Os pesquisadores dispõem de uma vasta gama de ferramentas para extrair

parâmetros que podem indicar um padrão rítmico oscilatório que influencia os dados. Esses métodos variam desde a inspeção visual básica de séries temporais até técnicas mais objetivas e avançadas. Uma abordagem particularmente útil para uma análise precisa envolve a parametrização de modelos de cosseno, que permite quantificar a periodicidade subjacente e pode fornecer uma medida de confiança associada a cada parâmetro.

Neste contexto, este trabalho apresenta uma biblioteca especializada chamada CircadiPy (Carvalho-Moreira et al., 2024), que oferece uma coleção abrangente de ferramentas e métodos poderosos para a análise cronobiológica. Como um kit de ferramentas de acesso aberto, ela permite que os pesquisadores realizem análises e interpretações aprofundadas de dados cronobiológicos. O objetivo principal da CircadiPy é fornecer um conjunto de funções eficaz e de fácil utilização para a análise de vários tipos de dados de séries temporais. Isso facilita a extração automatizada de parâmetros comumente utilizados em estudos de cronobiologia.

Portanto, o CircadiPy oferece um conjunto abrangente de recursos que permite a exploração detalhada das complexidades da biologia circadiana e auxilia no avanço da compreensão sobre como os processos biológicos são influenciados por ritmos internos. A biblioteca simplifica o processo de descoberta de percepções valiosas sobre as interações complexas entre os sistemas biológicos e o relógio circadiano, potencialmente abrindo caminho para novas intervenções terapêuticas e melhores resultados em saúde.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Desenvolver e validar uma biblioteca especializada em Python, denominada CircadiPy, que oferece um conjunto abrangente de ferramentas computacionais para análise cronobiológica de séries temporais, permitindo a extração automatizada de parâmetros rítmicos e a visualização de dados circadianos de forma acessível e eficiente para a comunidade científica.

2.2. Específico

Os objetivos específicos são:

- Implementar um sistema modular que permita o processamento completo de dados cronobiológicos em uma única rotina integrada.
- Desenvolver funcionalidades de importação compatíveis com diferentes formatos de dados experimentais, incluindo arquivos genéricos em formato ASCII, dados de telemetria (VitalView/ER4000) e sistemas de gaiolas inteligentes (IntelliCages).
- Integrar métodos de parametrização baseados no modelo Cosinor para extração de parâmetros rítmicos. Além, de análises não paramétricas complementares para séries temporais que não se ajustam adequadamente a funções senoidais.
- Criar ferramentas de visualização especializadas para dados cronobiológicos, incluindo actogramas, periodogramas, entre outros.
- Validar a precisão e confiabilidade da biblioteca através de comparações com métodos estabelecidos (JTK, Lomb-Scargle), dados simulados com valores de referência conhecidos e aplicação em experimentos reais de longa duração.
- Desenvolver documentação completa e exemplos práticos que facilitem a adoção da ferramenta pela comunidade científica, incluindo tutoriais em Jupyter Notebooks e disponibilização via repositórios públicos.

- Estabelecer uma plataforma open-source que permita contribuições da comunidade científica para expansão contínua das funcionalidades e métodos de análise cronobiológica.

3. METODOLOGIA

3.1. Implementação

O conjunto de ferramentas proposto pelo CircadiPy é composto por três módulos principais: (1) leitura de dados (nomeado *chrono_reader*), (2) análise (*chrono_rhythm*) e (3) visualização de resultados (*chrono_plotter*). Toda a estrutura do código é construída em torno de um objeto Python que atua como um contêiner de um determinado protocolo experimental, armazenando todas as informações necessárias para a manipulação dos dados e a aplicação de diferentes tipos de análises. Uma visão geral das rotinas e funcionalidades da biblioteca está apresentada pela Figura 31A.

Na maioria dos experimentos cronobiológicos, especialmente aqueles que envolvem avaliações de longo prazo (Ameen et al., 2022), os pesquisadores costumam trabalhar com diferentes períodos nos quais as condições experimentais podem variar, por exemplo: (a) uma fase de habituação - com condições ambientais cíclicas normais (claro-escuro, temperatura, etc.); (b) alterações nos estímulos ambientais (claro-claro, escuro-escuro, alimentação com tempo restrito, estímulos sensoriais, etc.); (c) períodos sob efeitos farmacológicos; (d) períodos pós-intervenções cirúrgicas; (e) intervenções metabólicas, entre outros. Assim, para avaliar o efeito de cada condição experimental na ritmicidade dos parâmetros ao longo dessas fases, os intervalos da série temporal de dados podem ser rotulados de forma correspondente. O módulo (1), de leitura de dados, permite ao usuário atribuir esses rótulos a cada estágio do experimento, o que, por sua vez, facilita a divisão da série temporal contínua em seções independentes que podem ser analisadas e comparadas de forma distinta, conforme mostrado pela Figura 31B.

O algoritmo presente no módulo *chrono_reader*, contempla basicamente a classe *read_protocol*, que é responsável por instanciar objetos que encapsulam o conjunto de dados experimentais como uma série temporal contínua, organizando-a em estágios. Para tal, são necessários três parâmetros principais: (a) um diretório de arquivos indicando a localização do arquivo de dados; (b) o Zeitgeber Time (ZT) como referência temporal; e (c) um

dicionário Python contendo informações cruciais sobre os estágios do protocolo. O último inclui detalhes como a duração de cada estágio, seu rótulo correspondente e o tipo de ciclo claro:escuro.

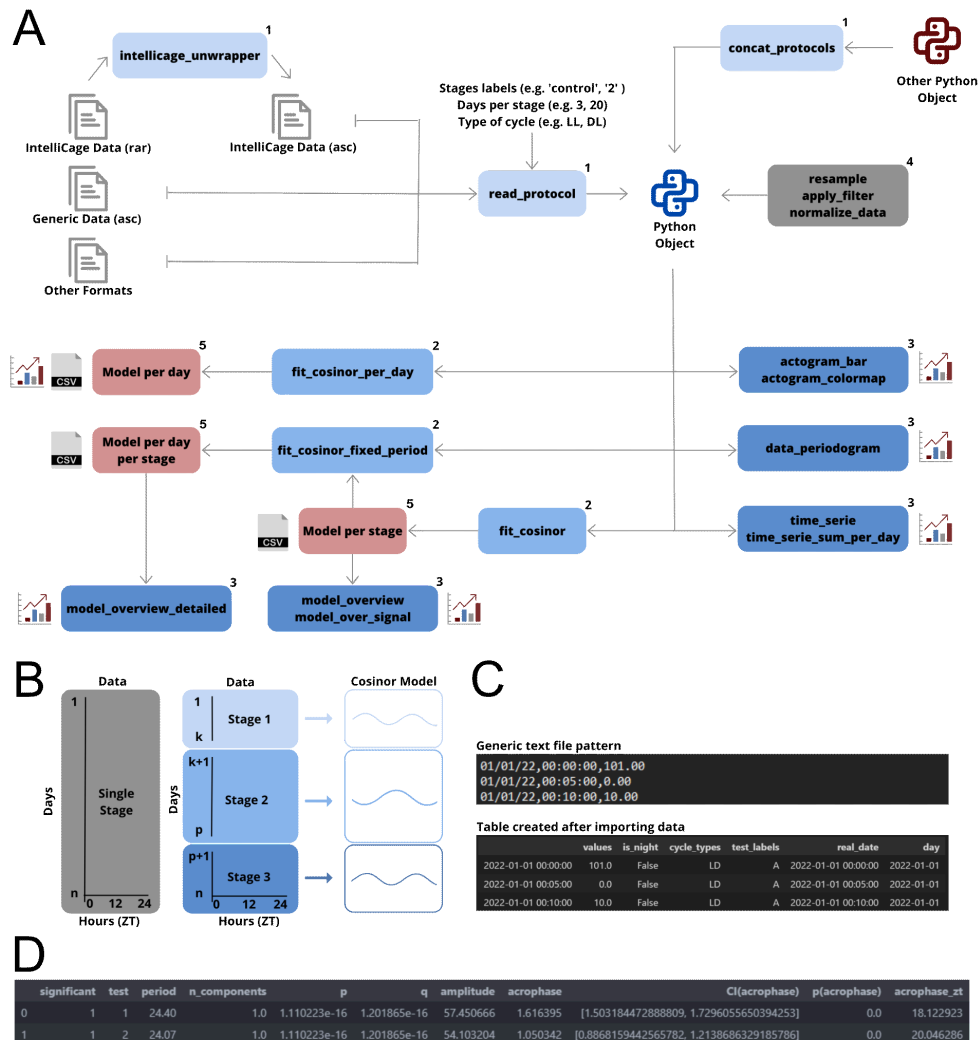


Figura 31 - Estrutura da biblioteca CircadiPy, figura retirada de Carvalho-Moreira (2024).

(A) O fluxograma ilustra a sequência lógica de execução das rotinas da biblioteca CircadiPy. As caixas indicadas com o número 1 na parte superior representam as funções do módulo *chrono_reader*, enquanto as caixas com o número 2 correspondem às funções do módulo *chrono_rhythm*. As funções marcadas com o número 3 pertencem ao módulo *chrono_plotter*, e aquelas com o número 4 estão relacionadas à modificação dos atributos do objeto que contém os dados. Ainda, as funções que geram figuras como saída estão indicadas com um ícone de gráfico, enquanto as parametrizações exportadas estão marcadas com o número 5 e um ícone de planilha (formato CSV). (B) O protocolo experimental pode ser dividido em estágios, de acordo com a estrutura do experimento. Para cada estágio, as funções de modelagem podem ser aplicadas de forma independente. (C) A figura superior mostra as três primeiras linhas de um arquivo texto no formato genérico exigido para correta importação dos dados. A figura inferior apresenta os mesmos dados após aplicação da função *read_protocol*, que realiza a leitura e organização do conteúdo. (D) Exemplo das principais colunas da saída gerada pela função *fit_cosinor*.

É de se notar, que o tipo de ciclo luminoso desempenha um papel fundamental em estudos cronobiológicos, pois define as condições de iluminação durante o experimento, sendo a luz o principal sincronizador do relógio circadiano. Os quatro protocolos fotoperiódicos possíveis são: (a) claro-claro (LL, do inglês *Light-Light*, ou luz constante); (b) escuro-claro (DL, do inglês *Dark-Light*); (c) claro-escuro (LD, do inglês *Light-Dark*); ou (d) escuro-escuro (DD, do inglês *Dark-Dark*, ou escuridão constante). Essas especificações, bem como as demais incluídas no dicionário Python citado acima, são essenciais para uma interpretação e análise corretas dos dados, pois fornecem informações sobre como as fases de luz e escuridão impactam os ritmos biológicos em estudo.

Portanto, a classe *read_protocol* gera um objeto Python principal, vinculado a um determinado protocolo experimental. No processo de instância, a partir dos dados fornecidos pelos parâmetros, uma tabela é criada como atributo, conforme exemplificado pela Figura 31C. As informações organizadas nessa tabela incluem a data, unidades de tempo, rótulos dos estágios do protocolo, tipo de ciclo, uma etiqueta booleana (verdadeiro ou falso) indicando se o ponto temporal corresponde a um período de escuridão, e os valores do parâmetro em análise, como atividade locomotora, temperatura ou expressão gênica. O objeto criado será utilizado como entrada para todas as análises subsequentes disponíveis na biblioteca.

Para importar dados genéricos, é necessário um arquivo texto em formato ASCII não delimitado (formato .ASC), contendo um valor amostrado uniformemente por linha no padrão dd/mm/aa,HH:MM:SS,VV.VV. Os componentes de cada amostra são: “d” para dia, “m” para mês, “a” para ano, “H” para hora, “M” para minuto, “S” para segundo, e “V” para o valor da amostra, com casas decimais separadas por ponto — note que, apenas “V” pode conter valores decimais com múltiplas casas (ex.: 147.36, 42.8, 1.987) —. Em muitos casos, apenas a hora está disponível, sendo necessário definir uma data arbitrária do experimento para obedecer ao formato (Figura 31C). Caso o dispositivo de aquisição não possua uma opção para exportar dados em formato de texto (formato .TXT), é possível adaptar funções para realizar essa conversão, para isso, o Python oferece um amplo repertório de soluções.

Como exemplo dessa conversão, a biblioteca possui rotinas implementadas para ler arquivos de duas fontes comerciais específicas: as gaiolas inteligentes IntelliCages (TSE-Systems) e os aparelhos de telemetria VitalView com placas ER4000 Energizer/Receiver. Neste último caso, uma função decodifica o arquivo de texto gerado pelo sistema de forma similar ao processo de leitura de arquivos genéricos. Para os dados provenientes de IntelliCages, o processo envolve três etapas iniciais realizadas pela função *intelligage_unwrapper*: (a) uso da biblioteca PyMice (Dzik et al., 2018) para extrair dados do arquivo compactado (formato .RAR) em formato proprietário; (b) transformação dos dados com amostragem irregular em uma tabela com frequência de amostragem fixa; (c) armazenamento de arquivos texto contendo o número de visitas aos cantos da gaiola por intervalo de tempo. Após essa etapa, os dados de cada animal podem ser importados pela classe de leitura usando uma função de decodificação semelhante à apresentada para casos genéricos.

O CircadiPy permite também a concatenação de objetos de protocolo. Essa funcionalidade facilita a leitura de dados provenientes de arquivos separados, especialmente em protocolos de longa duração, nos quais é comum dividir os registros em múltiplos arquivos. Além disso, o design da biblioteca prevê expansão e flexibilidade e, como parte do esforço de iniciativas *open-source*, funções adicionais de leitura de dados podem ser criadas e incorporadas, desde que sejam capazes de transformar os sinais de entrada em uma tabela compatível com o padrão estabelecido, conforme, novamente, a Figura 31C.

Outro recurso essencial do CircadiPy é sua capacidade de identificar e lidar com dados ausentes na série temporal, representando as lacunas com símbolos não numéricos (valores NaN, do inglês *Not-a-Number*). Quando desejado, a biblioteca pode preencher esses valores utilizando a média das medições adjacentes sem comprometer os deslocamentos de fase circadiana, importantes nas análises cronobiológicas.

Em Python, assim como em outras linguagens orientadas a objetos, um objeto é uma instância de uma classe que possui tanto atributos (dados associados aos objetos instanciados) quanto métodos (funções associadas à classe que processam os atributos). O objeto da classe *read_protocol* possui

métodos que permitem processar a série temporal bruta para gerar um conjunto de dados mais adequado para extração de parâmetros, como por exemplo: (a) reamostragem do sinal (função *resample*); (b) média móvel; (c) filtro de Savitzky-Golay (função *apply_filter*); e (d) normalização dos dados (função *normalize_data*), que pode ser feita pelo método min-max ou pelo z-score. Além disso, outras funções mais básicas permitem recortes específicos por dia ou exclusão de dias indesejados e artefatos.

Após a importação adequada dos dados para o objeto Python, o módulo (2), de análise, pode ser aplicado à série temporal, como mostrado pelo esquema apresentado na Figura 31A. Esse módulo é responsável pela parametrização de modelos cossenoidais utilizando o método cosinor (Halberg et al., 1967), implementado pela biblioteca CosinorPy (Moškon, 2020). O CircadiPy atua como ponte nesse processo, garantindo a configuração correta e passando os dados para a função de parametrização do modelo. Essa abordagem permite estimar parâmetros como o período, a acrofase (momento de pico da curva senoidal), o mesor (linha média estimada do ritmo) e a amplitude (diferença entre o mesor e o pico da curva cossenoidal). Esses valores são validados estatisticamente para melhor ajustar a série temporal, fornecendo informações valiosas sobre os ritmos biológicos subjacentes (Vitaterna et al., 2001).

A modelagem pode ocorrer de três formas distintas: (a) parametrização do modelo cosinor para cada estágio utilizando todos os dados do estágio (*fit_cosinor*); (b) parametrização diária utilizando o melhor período ajustado previamente (*fit_cosinor_fixed_period*); e (c) parametrização diária desconsiderando os estágios (*fit_cosinor_per_day*). Nesta última, é possível aplicar uma janela deslizante para o cálculo dos parâmetros (ex.: se for selecionada uma janela de 3 dias, os modelos serão calculados para os dias 1-3, 2-4 e assim por diante).

Para cada uma dessas modalidades, é gerada uma tabela contendo os parâmetros analisados por dia, estágio rotulado ou janela de dias. Essa tabela é derivada da resposta proveniente do CosinorPy e inclui: período (definido pelo usuário), acrofase em radianos, acrofase referida ao tempo ZT, amplitude, mesor, valores estatísticos associados e intervalo de confiança. Além disso, uma coluna booleana (1 para modelos estatisticamente significativos, 0 caso

contrário) indica quando todos os p-valores são menores que 0,05 e a amplitude estimada é maior que 0,01. Um exemplo de saída com várias dessas colunas pode ser visto na Figura 31D.

Além do método Cosinor, o módulo de análise também contempla outras abordagens para extração de parâmetros relevantes. Por exemplo, foi implementada uma metodologia não paramétrica baseada no cálculo da latência temporal dos percentis da soma acumulada entre dois pontos consecutivos de vale (Ekhart et al., 2018). Essa técnica revela aspectos como o período do ciclo circadiano, marcadores de fase e métricas descritivas do formato de onda do sinal. Tal abordagem permite analisar séries temporais que não se ajustam bem a funções senoidais, como observado em padrões variados de cronotipos dentro de uma mesma linhagem de animais ou em experimentos com temperatura corporal humana (Ekhart et al., 2018; Pfeffer et al., 2015; Wicht et al., 2014).

O módulo (3), de visualização, pode ser utilizado em dois momentos distintos: (a) para uma visualização geral dos dados importados e (b) após a parametrização dos modelos anteriormente mencionados. No caso (a), basta o possuir uma instância do objeto *read_protocol* para gerar actogramas (em barras ou mapa de cores), periodogramas (periodograma convencional ou pelo método de *Welch*) e gráficos da série temporal completa. No caso (c), são necessários tanto a instância do objeto *read_protocol* quanto os resultados da modelagem, possibilitando a criação de gráfico como: sobreposição do modelo à série temporal, ilustração dos parâmetros do modelo por estágio com período fixo, exibição dos parâmetros por dia, sobreposição do modelo calculado para cada dia aos dados, entre outros. Vários dos gráficos citados estão posteriormente apresentados na Seção 4, pelas Figuras 33, 34 e 35.

Para garantir a reprodutibilidade dos resultados, cada arquivo gerado pelo CircadiPy é acompanhado por um texto descritivo com o mesmo nome, detalhando as características da análise, o pré-processamento realizado e os parâmetros utilizados. Além disso, a biblioteca conta com um módulo de validação que gera e avalia sinais com períodos definidos, permitindo testes abrangentes das funcionalidades do sistema. Através da função *simulate_protocol*, é possível gerar diversos sinais cíclicos com razão sinal-ruído variáveis e com formato senoidal, quadrado ou em dente-de-serra.

3.2. Dados obtidos do CircaDB

O CircaDB (Pizarro et al., 2012) é um banco de dados abrangente que contém milhares de perfis de expressão gênica derivados de diversos tecidos e espécies. A partir dele, um grupo de amostras de expressão gênica, extraídas do coração de camundongos, foi selecionado aleatoriamente com o objetivo de comparar os parâmetros dos modelos gerados pelo CircadiPy e os métodos JTK (Hughes et al., 2010) e Lomb-Scargle (Lomb, 1976), disponibilizados pelo próprio CircaDB. Foram adquiridas cem parametrizações para cada método, sendo mantidas apenas aquelas com períodos circadianos entre 20 e 28 horas.

Os conjuntos de dados foram obtidos em formato CSV (valores separados por vírgula) e continham registros de expressão gênica com frequência de amostragem de 2 horas ao longo de 2 dias, totalizando 24 pontos de medição. Para garantir a uniformidade da análise, ambos os dados foram convertidos para o padrão genérico compatível com o CircadiPy e posteriormente importados para análise. Com o intuito de assegurar a reprodutibilidade dos resultados, os dados analisados, juntamente com a rotina utilizada no estudo, estão disponíveis no repositório do CircadiPy no GitHub.

3.3. Dados simulados pelo CircaInSilica e pelo CircadiPy

CircaInSilica é uma aplicação *web* desenvolvida para a geração de dados sintéticos em biologia genômica (Hughes et al., 2017). A partir dessa plataforma, foram gerados e baixados 128 conjuntos de dados circadianos simulados, cada um contendo 48 pontos de dados com frequência de amostragem de 1 hora. Os conjuntos simulados apresentaram períodos variando de 22 a 26 horas e amplitudes entre 1 e 6 unidades arbitrárias. Esses resultados foram exportados em formato CSV e, posteriormente, convertidos para o padrão genérico compatível com o CircadiPy.

Por outro lado, o módulo de simulação do CircadiPy foi utilizado para gerar 10 arquivos de dados para cada uma das 3 formas de sinal diferentes (senoidal, quadrada e dente-de-serra) e para 6 níveis distintos de razão sinal-ruído (sem ruído, 0.1 dB, 0.5 dB, 1 dB, 5 dB, 10 dB), totalizando 240

simulações. Cada conjunto de 10 simulações foi configurado para conter 2 estágios, rotulados como “1” e “2”, com o número de dias variando aleatoriamente entre 3 e 10, e o número de ciclos com períodos entre 22 e 26 horas. Para garantir a reprodutibilidade, a semente do gerador de números aleatórios foi fixada arbitrariamente em 42. Ainda, um arquivo de descrição foi salvo para servir como referência nas análises comparativas.

Assim como nos demais testes, os dados analisados e as rotinas utilizadas nos estudos descritos acima estão disponíveis no repositório do CircadiPy no GitHub.

3.4. Dados cronobiológicos adquiridos usando sensores de telemetria e IntelliCages

Os dados foram coletados utilizando camundongos machos adultos da linhagem C57Bl/6J, com aproximadamente 8 semanas de idade. Os animais foram expostos a diferentes protocolos de ciclo claro-escuro (LD): um ciclo de 12:12 horas (12 h de luz: 12 h de escuro, sendo L: 200-300 Lux; D: luz vermelha fraca durante o manejo, 0,5-1 Lux; início da fase clara às 20h, ZT0) ou à escuridão constante (DD). Durante todo o experimento, os animais tiveram acesso irrestrito à comida e à água. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o parecer CEUA: 170/2021.

Para avaliar a temperatura corporal e a atividade locomotora espontânea (SLA, do inglês *Spontaneous Locomotor Activity*) dos animais, foram implantados sensores de telemetria. Antes da cirurgia, os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (16 mg/Kg, i.p.). Em seguida, os sensores de telemetria (modelo G2 EMitter, Mini-Mitter Company, Sun River, OR, EUA) foram implantados na cavidade peritoneal, conforme procedimento previamente descrito (Fernandes et al., 2021). Após a implantação, a musculatura e a pele foram suturadas. Como medida preventiva, os animais receberam o antibiótico cefalexina (34 mg/Kg, via oral), administrado 12 horas antes e imediatamente após a cirurgia. Além disso, foi aplicada uma dose do anti-inflamatório

analgésico Banamine® (50 mg/ml, Schering-Plough), na concentração de 1 mg/Kg de peso corporal.

Cada animal com sensor implantado foi alojado em uma caixa juntamente com outros quatro camundongos sem implantes, a fim de evitar os efeitos do isolamento social. A caixa foi posicionada sobre uma placa receptora ER4000 Energizer/Receiver (Mini-Mitter Company, Sun River, OR, EUA), conectada em série a um computador com o software de aquisição de dados VitalView® Data Acquisition System, versão 4.0. Os sensores associados à placa receptora registraram os dados de SLA e temperatura dos animais implantados em intervalos de um minuto.

O mesmo protocolo fotoperiódico foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais nas gaiolas inteligentes IntelliCages. Para isso, cada camundongo recebeu um transponder de identificação por radiofrequência subcutâneo, sob anestesia com isoflurano a 1%, permitindo que o sistema reconhecesse o animal e simultaneamente registrasse suas visitas aos diferentes cantos da caixa. Os camundongos foram alojados nas IntelliCages (n = 12 animais por caixa), onde permaneceram por 74 dias, sendo os 5 primeiros dias dedicados à aclimatação ao novo ambiente e os demais para avaliação da atividade locomotora sob diferentes protocolos de ciclo claro-escuro. Os dados das visitas individuais de cada animal aos cantos da caixa com acesso ao bebedouro foram posteriormente analisados e processados.

Dois animais de cada experimento (ou seja, ER4000/VitalView e IntelliCage) foram analisados com o CircadiPy, com o objetivo de validar as funcionalidades da biblioteca aplicadas a experimentos de longa duração.

3.5. Rotina de análise

A validação e os testes do CircadiPy foram realizados de forma criteriosa utilizando cinco abordagens distintas: (1) conjuntos de dados simulados gerados pela aplicação CircaInSilica foram analisados, e os resultados foram cuidadosamente comparados com os valores de referência (*ground-truth*) fornecidos pela biblioteca original, garantindo a precisão e confiabilidade dos cálculos realizados pelo CircadiPy; (2) para o mesmo propósito, conjuntos de dados simulados gerados pelo módulo de simulação do

CircadiPy foram analisados por meio de modelos Cosinor e uma análise não paramétrica (Ekhart et al., 2018), sendo os resultados comparados com os valores definidos na geração dos dados; (3) o desempenho do CircadiPy frente a outros métodos de estimativa de parâmetros rítmicos foi avaliado por meio da comparação dos períodos e fases da expressão gênica obtidos a partir dos métodos JTK e Lomb-Scargle, disponibilizados pelo banco de dados CircaDB; (4-5) por fim, dados reais obtidos em IntelliCages e com o sistema VitalView foram analisados, validando a aplicabilidade do CircadiPy em contextos experimentais reais e demonstrando sua robustez frente a diferentes fontes de dados.

A rotina utilizada para processar essas cinco abordagens foi estruturada de forma uniforme. Para cada uma, foi criado um Jupyter® Notebook (disponível no repositório do GitHub), com o objetivo de aumentar a legibilidade, simplificar o processo e garantir a reprodutibilidade dos passos de análise, explorando a estrutura do *notebook* que permite a combinação de blocos de código e textos explicativos em Markdown.

Nas abordagens (1) e (3), o primeiro passo envolveu a aquisição dos dados das aplicações CircaDB e CircaInSilica, seguido da conversão dos arquivos CSV obtidos para o formato genérico ASC compatível com o CircadiPy. Na abordagem (2), foi necessário executar simulações com a função *simulate_protocol* do CircadiPy para cada uma das formas de sinal e níveis de ruído especificados anteriormente. Todas as rotinas incluíram também blocos de código destinados à definição de pastas para leitura dos sinais e arquivamento dos resultados.

Após a obtenção e organização dos dados, foi seguido um fluxo de trabalho semelhante ao ilustrado na Figura 31A, que compreende as etapas de importação, pré-processamento, ajuste dos modelos Cosinor, extração de parâmetros da série temporal e visualização gráfica dos dados e resultados. Para as abordagens (1) a (3), era essencial compará-las com outros métodos ou com os valores de referência (*ground-truth*), e por isso foi adicionado um bloco de código responsável por realizar essas comparações e gerar os gráficos correspondentes.

Tabela 6 - Esquema das etapas de análise empregadas em cada abordagem metodológica para testar e validar as funcionalidades do CircadiPy.

N	Origem	Dados	Tratamento	Método de modelagem	Figuras	Comparação
1	CircalN Silica	Arquivo único para criar objeto	Filtro (média móvel de 3 amostras)	<i>fit_cosinor</i>	Modelos e comparações	Ground-truth
2	CircadiPy	Arquivo único para criar objeto	Não se aplica	<i>fit_cosinor</i> <i>fit_cosinor_fixed_perio</i> <i>d</i> <i>fit_cosinor_per_day</i>	Actogramas, periodogramas, série temporal, modelos e comparações	Ground-truth
3	CircaDB	Arquivo único para criar objeto	Normalização (minmax), filtro (média móvel de 3 amostras)	<i>fit_cosinor</i>	Modelos e comparações	JTK and Lomb-Scargle estimates
4	Intelli Cages	Arquivo único para criar objeto	Normalização (minmax), filtro (média móvel de 3 amostras)	<i>fit_cosinor</i> <i>fit_cosinor_fixed_perio</i> <i>d</i>	Actogramas, periodogramas e modelos	None

Embora o foco tenha sido a comparação da análise Cosinor do CircadiPy com métodos convencionais, a estrutura da biblioteca permite e incentiva a integração de técnicas mais avançadas, como o BooteJTK (Hutchison et al., 2018). Nesse sentido, o CircadiPy oferece rotinas de saída que facilitam a visualização justa e abrangente dos resultados com diferentes estratégias de processamento, fornecendo a base para a melhoria da estimação de parâmetros em diversas variáveis fisiológicas com comportamento oscilatório. As etapas e funções aplicadas em cada abordagem estão descritas na Tabela 6.

Além disso, como as séries temporais importadas pelo CircadiPy são amostradas em intervalos fixos, ao gerar histogramas (como no caso dos actogramas), pode ocorrer de uma amostra específica cair em diferentes intervalos adjacentes, dependendo do início da aquisição ou da taxa de amostragem. Para corrigir essa possível inconsistência, foi aplicado um filtro de média móvel de segunda ordem com janela de três amostras. Esse processo de filtragem visa corrigir erros, suavizar os dados e remover ruídos. Assim como na normalização, os métodos de filtragem podem ser ajustados por meio

dos parâmetros *type*, *order* e *window* da função *apply_filter*. Importante destacar que, na abordagem (2), nenhum pré-processamento foi utilizado, permitindo validar a parametrização do modelo Cosinor sem modificações nos dados. Para avaliar as análises não paramétricas, estas foram aplicadas a um conjunto de dados com forma quadrada e razão sinal-ruído de 5 dB.

Para validar os resultados obtidos pelo CircadiPy com a função *fit_cosinor* da CosinorPy, foi realizado um estudo comparativo com base na média e no desvio padrão dos erros entre os valores estimados de período, amplitude e/ou acrofase pelo CircadiPy e os valores correspondentes obtidos por outros métodos ou definidos como *ground-truth*. Os erros foram calculados como a diferença entre os resultados do CircadiPy e os valores de referência. Um valor negativo indica que a estimativa do CircadiPy foi inferior à referência; um valor positivo indica o contrário.

Todas as etapas descritas envolveram a aplicação direta das funções e métodos dos módulos do CircadiPy. Todos os resultados foram salvos com nomes informativos, acompanhados de suas respectivas figuras. Além disso, os arquivos e rotinas essenciais para a análise das abordagens de (1) a (3) estão disponíveis no repositório do CircadiPy no GitHub, permitindo que usuários e leitores possam executar o código por conta própria.

3.6. Documentação

O desenvolvimento do projeto foi gerenciado em um repositório GitHub (<https://github.com/nnc-ufmg/circadipy>), que hospeda o código-fonte e suas versões. Também foi criada uma documentação do sistema (<https://circadipy.readthedocs.io/en/latest/>), com o objetivo de divulgar e facilitar o acesso ao *software*. Para isso, foi utilizada a biblioteca Sphinx e o documento formatado foi, então, hospedado na plataforma *Read the Docs*. Além disso, o programa foi publicado no PyPi (Python Package Index, <https://pypi.org/project/circadipy/>), uma plataforma que hospeda e distribui pacotes Python, permitindo a instalação do CircadiPy de maneira simples e rápida.

De forma complementar, foi criado e adicionado ao repositório um Jupyter® Notebook descritivo, explicando e exemplificando passo a passo o

processo completo de análise utilizando o CircadiPy. A documentação completa inclui um guia do usuário e uma referência da Interface de Programação de Aplicações (API, do inglês Application Programming Interface), que descreve os módulos, funções e saídas da biblioteca.

O guia do usuário é dividido nas seguintes seções, com o intuito de orientar adequadamente o usuário quanto à instalação e utilização da biblioteca: (1) Antes da instalação: esta seção orienta o processo de instalação de dependências de compiladores da Microsoft, necessárias para a execução do PyMICE; (2) Sistema de gerenciamento de pacotes e ambientes: descreve como o usuário deve utilizar o programa no contexto do computador local, começando pelo tipo de instalação do Python recomendada; (3) Criação de ambiente e instalação: esta seção descreve como o usuário pode criar um ambiente isolado onde o programa será executado juntamente com todas as suas dependências, sem interferir em outros pacotes instalados no sistema; (4) Utilização com Jupyter Notebooks: dando ênfase à usabilidade, a análise com o CircadiPy é baseada no uso de Jupyter® Notebooks. Esta seção descreve um processo simplificado que utiliza um ambiente Python para iniciar o servidor Jupyter, o qual, por sua vez, abre a interface em um navegador. A partir dessa interface, o guia explica como criar um novo notebook para utilizar a biblioteca CircadiPy na análise e visualização de dados.

4. RESULTADOS

Para todos os genes submetidos à análise, a representação gráfica dos valores da série temporal, sobreposta ao modelo gerado pela CosinorPy, apresentou um ajuste coerente. A Figura 32 ilustra esse resultado, acompanhada de histogramas que representam os erros de parametrização mencionados anteriormente.

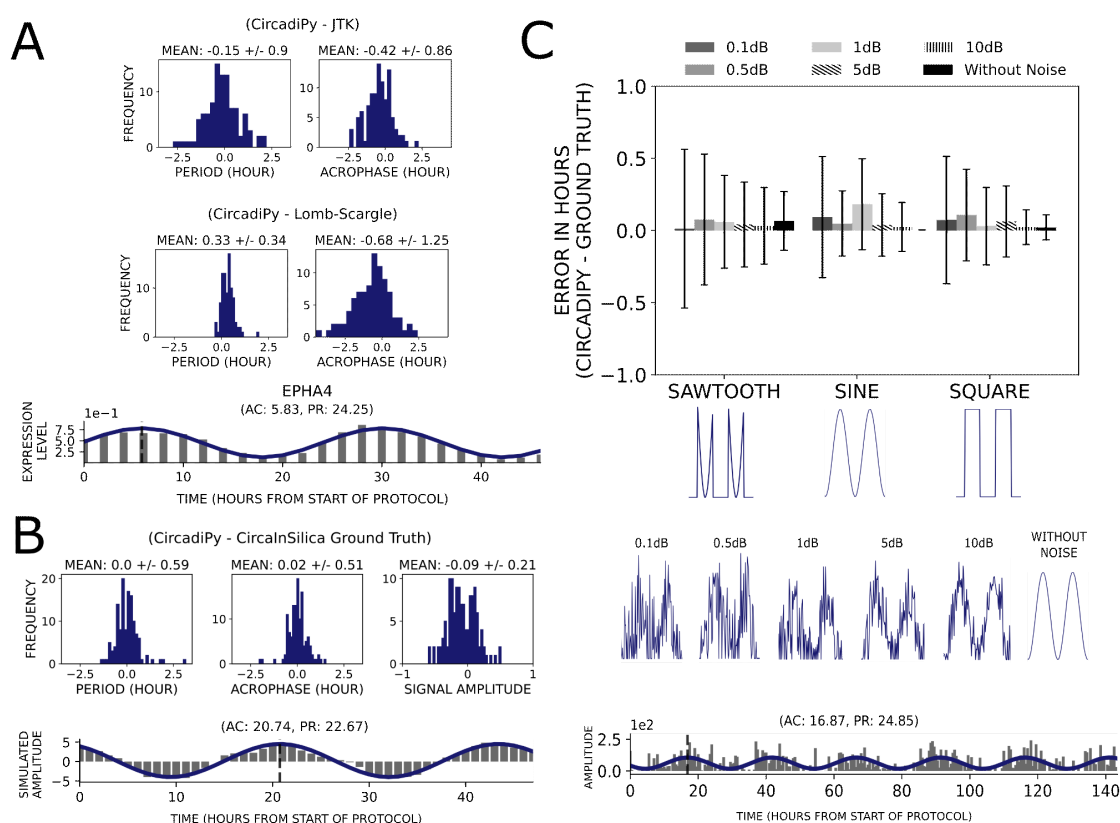


Figura 32 - Comparação entre modelos produzidos a partir de dados do CircaDB, CircalInSilica e simulações do CircadiPy, figura retirada de Carvalho-Moreira (2024).

Em cada painel, são apresentados histogramas que ilustram as discrepâncias entre os valores dos parâmetros obtidos com a biblioteca CircadiPy utilizando o modelo CosinorPy e aqueles obtidos por um método comparativo. Ainda, cada painel inclui uma figura representativa gerada pela função *model_over_signal*, que mostra os dados analisados sobrepostos ao modelo cossenoidal correspondente. (A) Erros entre os resultados de parametrização do CircadiPy e os métodos JTK e Lomb-Scargle, fornecidos pelo CircaDB, juntamente com um exemplo da expressão do gene Epha4, com a série temporal sobreposta ao modelo. (B) Erros entre os resultados do CircadiPy e os valores de referência (*ground-truth*) utilizados nas simulações do CircalInSilica. Na parte inferior, é exibido um exemplo de simulação (simulação 101) com a série temporal sobreposta ao modelo. (C) Erros entre os resultados do CircadiPy e os valores de referência utilizados para simular diferentes formas de sinal com variados níveis de ruído, conforme ilustrado no painel central. A parte inferior apresenta um exemplo de simulação de série temporal com forma quadrada (simulação 9, com razão sinal-ruído de 5 dB) sobreposta ao modelo.

A partir da análise comparativa entre os resultados derivados do CircadiPy utilizando a CosinorPy e o método JTK, aplicados ao mesmo banco de dados disponível no CircaDB, observou-se um erro médio de $-0,15 \pm 0,9$ horas para a estimativa do período e $0,42 \pm 0,86$ horas para a estimativa da acrofase (Figura 32A, painel superior). Esses resultados demonstram um desempenho comparável entre os dois métodos, uma vez que os erros obtidos são significativamente menores que a frequência de amostragem (i.e., 2 horas). Na comparação com o método Lomb-Scargle, foram observados erros médios de $0,33 \pm 0,34$ horas para o período e $0,68 \pm 1,25$ horas para a acrofase (Figura 32A, painel intermediário). Além disso, um exemplo do modelo gerado pelo CircadiPy é apresentado sobreposto aos dados do gene EPHA4, obtido do CircaDB (Figura 32A, painel inferior).

A comparação com os dados simulados a partir da plataforma CircaInSilico revelou erros médios de $0 \pm 0,59$ horas para o período, $0,02 \pm 0,51$ horas para a fase e $-0,09 \pm 0,21$ para a amplitude (Figura 32C). É importante destacar que os valores da fase, expressos em horas, foram obtidos por meio da conversão realizada pelo CircadiPy a partir dos valores originalmente expressos em radianos pela CosinorPy. As simulações realizadas utilizando o próprio CircadiPy apresentaram resultados altamente congruentes, com erro absoluto médio na parametrização do período consistentemente abaixo de 0,5 hora em todos os casos, e variação máxima inferior a 0,75 hora.

O aumento dos erros observados nas simulações do CircaInSilico pode ser explicado pela ausência de pré-processamento na análise, o que evidencia a robustez do CircadiPy mesmo na análise de dados brutos. Ainda, a análise revelou ausência de correlação entre o nível de ruído e os resultados (teste ANOVA 2-vias, $p > 0,05$), assim como nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais (teste ANOVA 2-vias, $p > 0,05$; Figura 32C, painel superior).

Antes de avançar para os resultados dos experimentos *in vivo*, uma visualização mais detalhada dos sinais simulados pelo CircadiPy foi realizada e está representada na Figura 33. Essa ilustração apresenta o conjunto de dados de uma simulação com formato quadrado e relação sinal-ruído de 5 dB. A série

temporal é exibida na Figura 33A, enquanto a Figura 33B mostra o mesmo conjunto de dados sob a forma de actograma.

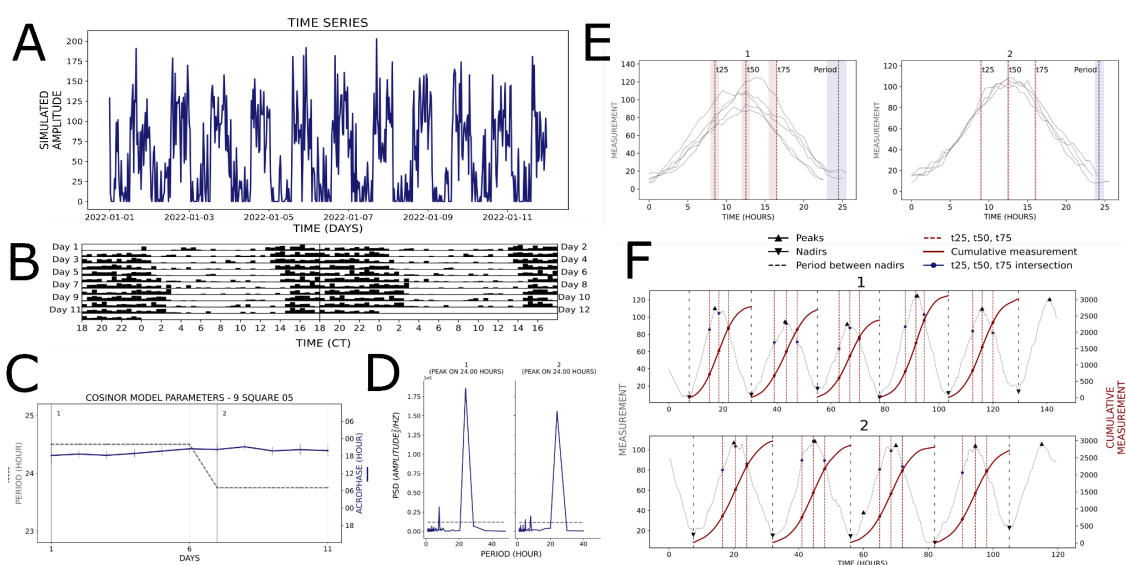


Figura 33 - Saídas representativas da simulação do CircadiPy (simulação 9 com razão sinal-ruído de 5 dB), figura retirada de Carvalho-Moreira (2024).

(A) Série temporal. (B) Actograma em gráfico de barras. (C) Estimativa do período para cada estágio (eixo vertical à esquerda) e estimativa da acrofase para cada dia (eixo vertical à direita). (D) Densidade espectral de potência utilizando periodograma. (E) Para cada segmento da série temporal entre dois pontos de vale: valores medianos de t_{25} , t_{50} , t_{75} e do período. (F) Representação expandida do painel E, mostrando cada ponto de vale, a soma cumulativa entre dois vales consecutivos e os pontos $t_{25}/t_{50}/t_{75}$.

Ao estimar os parâmetros do modelo, observou-se que os dois estágios do protocolo foram parametrizados de forma distinta quanto ao período, e as acrofases foram estimadas diariamente mantendo o período fixo (Figura 33C). Destaca-se que as estimativas de fase seguem fielmente o padrão observado no actograma, cujo ponto médio de atividade permanece próximo de 20 horas (Figura 33B), correspondendo à acrofase estimada (Figura 33C). Por fim, os resultados obtidos pela análise dos percentis da medida cumulativa entre os vales da série temporal indicam consistência na forma do sinal ao longo dos ciclos (Figura 33E), especialmente no segundo estágio do exemplo analisado, que apresenta baixa dispersão. A visualização expandida na Figura 33F, ilustra a extração dos picos, vales e dos tempos $t_{25}/t_{50}/t_{75}$ a partir dos dados filtrados.

Os resultados obtidos com os experimentos animais realizados no sistema IntelliCage apresentaram um grau notável de homogeneidade

conforme mostrado pela Figura 34. A atividade locomotora dos camundongos exibiu um padrão estereotipado de *free-running*, caracterizado pelo avanço diário da acrofase sob condição de escuridão constante (representada pelos dias com fundo cinza no actograma da Figura 34A), em conformidade com o esperado.

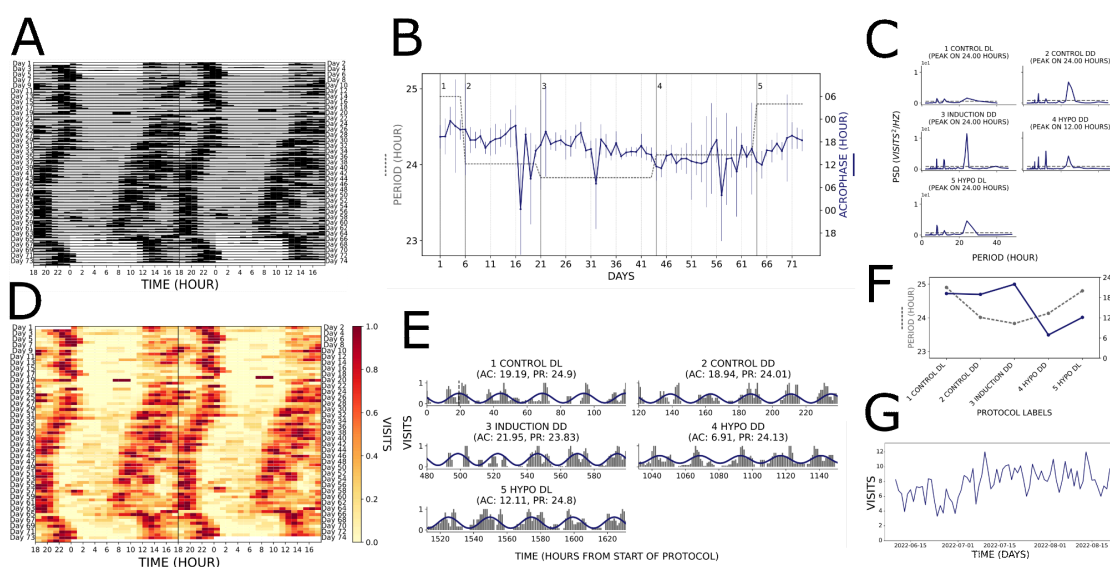


Figura 34 - Saídas representativas de um protocolo experimental real de longa duração utilizando o sistema IntelliCage, figura retirada de Carvalho-Moreira (2024).

Avaliação indireta da atividade locomotora de camundongos sob os protocolos fotoperiódicos claro:escuro (L:D, 12:12) e escuridão constante (D:D; fundo cinza), por meio do número de visitas aos cantos da caixa (exemplo extraído dos dados do animal 19). (A) Actograma em gráfico de barras mostrando o padrão diário de atividade locomotora sob os protocolos fotoperiódicos L:D (fundos branco e cinza, respectivamente) e D:D (fundo cinza). (B) Estimativas de período e acrofase para cada estágio em cada dia. (C) Densidade espectral de potência utilizando o método de Welch. (D) Actograma em mapa de calor. (E) Sobreposição dos dados de cada estágio experimental com o modelo cossenoidal ajustado. (F) Visão geral das estimativas dos parâmetros do modelo: período (eixo vertical esquerdo) e acrofase (eixo vertical direito). (G) Soma do número de visitas diárias (indicador de atividade).

O conjunto de dados normalizado, que representa a frequência de visitas, pôde ser analisado de duas formas: por meio de actogramas de barras (Figura 34A) e como mapa de calor (Figura 34D). O gráfico da atividade diária total, representado pela Figura 34G, permite avaliar a continuidade da capacidade locomotora ao longo do experimento, enquanto a densidade espectral de potência estimada pelo método de Welch na Figura 34C fornece uma estimativa preliminar do valor do período do sinal — ainda que limitada pelo número reduzido de pontos amostrados.

Os resultados gerados pelo modelo cossenoidal puderam ser avaliados com relação aos atributos de período e fase. Essa avaliação é inicialmente apresentada na Figura 34F, que mostra uma redução do período sob escuridão constante. Também foi observada uma extensão da fase final quando os animais foram submetidos novamente ao ciclo claro-escuro (fundo branco e cinza no actograma, Figura 34A).

Esses mesmos parâmetros são apresentados de forma complementar na Figura 34B, oferecendo uma visão mais ampla do cenário experimental, com destaque para as estimativas diárias de fase ao longo dos diferentes estágios, cada uma com período fixado. Dessa forma, é possível comparar o padrão do actograma com as estimativas derivadas dos parâmetros modelados. De fato, o ponto médio de atividade observado no actograma encontra correspondência nos valores modelados, iniciando-se por volta da 18^a hora e diminuindo gradualmente até se aproximar das 12 horas antes do início do ciclo LD. Com a retomada do ciclo claro-escuro, o ponto médio da atividade retorna rapidamente à 18^a hora. Assim como nas análises anteriores, a representação visual dos dados e do modelo cossenoidal para cada estágio está ilustrada na Figura 34E.

Em relação aos dados obtidos por telemetria com o sistema ER4000 e software VitalView, foram explorados dois aspectos principais do CircadiPy: sua capacidade de lidar com diferentes tipos de medidas, incluindo dados de atividade e temperatura e sua eficácia na gestão de valores ausentes (NaN), resultantes da perda de registros por falha de energia elétrica — uma ocorrência presente nesse conjunto de dados.

Como esperado, os actogramas de barras que representam os padrões de atividade, assim como os mapas de calor da temperatura corporal, demonstraram de forma consistente uma correlação entre a atividade locomotora e a temperatura corporal em todos os conjuntos analisados, conforme mostrado pela Figura 35.

A biblioteca CircadiPy não se limita ao processamento de sinais, mas também oferece diversas funções voltadas para visualização de dados, incluindo variações em relação aos actogramas tradicionais, como o actograma em mapa de calor. Essa forma de exibição (Figuras 34D e 35), embora altere apenas a visualização gráfica dos dados, evidencia padrões de atividade

intensa que poderiam passar despercebidos em actogramas convencionais de barras. Este recurso também pode ser aplicado a qualquer série temporal (por exemplo, atividade locomotora, expressão gênica), facilitando a inspeção visual dos dados pelo pesquisador.

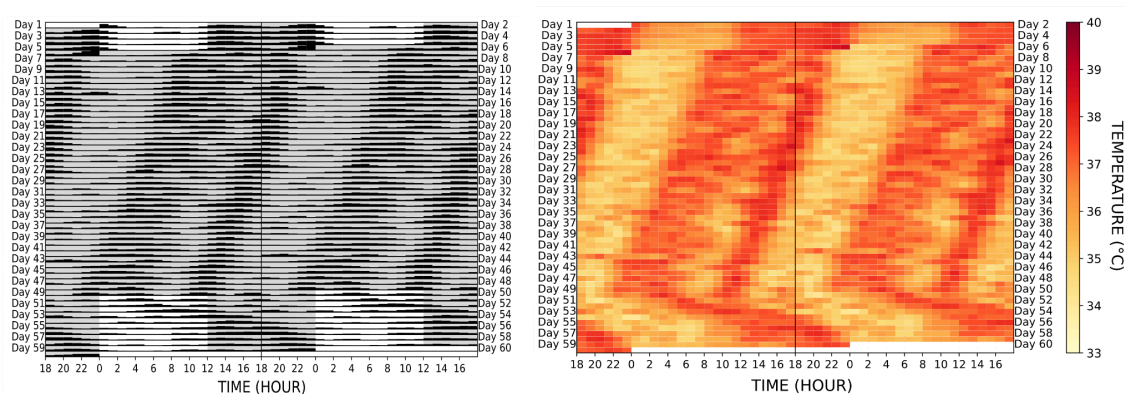


Figura 35 - Saídas representativas de um protocolo experimental real de longa duração utilizando o sistema ER4000 acoplado ao *software* de aquisição de dados VitalView® (exemplo extraído dos registros do animal 1).

Na esquerda, é apresentado o actograma em gráfico de barras da atividade locomotora, em seu estado não normalizado. Na direita, encontra-se o actograma em mapa de calor da temperatura corporal, também sem normalização. O protocolo fotoperiódico claro:escuro (ciclo LD 12:12) é representado por fundos branco e cinza, enquanto a escuridão constante (DD) é representada por fundo totalmente cinza.

Por fim, observou-se que o tratamento de valores ausentes (NaN) pelo CircadiPy foi realizado com eficiência, como pode ser melhor percebido nos dias de 1 a 7. As lacunas foram preenchidas com estimativas, o que aumenta a robustez do sistema frente a falhas na aquisição dos dados. As demais análises aplicadas aos dados das IntelliCages foram reproduzidas de forma análoga e, por apresentarem resultados semelhantes e consistentes, não foram apresentadas novamente neste documento.

5. DISCUSSÃO

A visualização e aplicação de métodos na análise de séries temporais rítmicas são extremamente importantes em diversas áreas, como física, meteorologia, biologia, entre outras. Desde a introdução da transformada de Fourier (Fourier, 1822), técnicas de análise espectral vêm sendo desenvolvidas e utilizadas para quantificar o período rítmico dos dados, incluindo o periodograma clássico (Schuster, 1898), o periodograma de Enright (Enright, 1965) e o periodograma de Lomb-Scargle (Lomb, 1976). Além disso, técnicas de regressão linear e não linear, como o modelo Cosinor (Halberg et al., 1967) e o JTK (Hughes et al., 2010), também fornecem intervalos de confiança estatísticos para extração de parâmetros como fase (acrofase) e amplitude.

Essas funções matemáticas podem ser aplicadas a praticamente qualquer série temporal, e existem diversas soluções para implementação de algoritmos computacionais que executam tais operações (Cooley & Tukey, 1965; Hughes et al., 2010; Moškon, 2020). De fato, muitas dessas soluções não foram inicialmente desenvolvidas para análise de dados cronobiológicos, mas sua aplicação é conveniente e apropriada, considerando que os padrões circadianos são, por natureza, rítmicos. Assim, a caracterização e investigação desse fenômeno é particularmente valiosa para estudos em cronobiologia.

As abordagens de validação multifacetadas utilizadas neste estudo demonstram, de forma conjunta, a credibilidade e versatilidade do CircadiPy como uma ferramenta robusta para análise de ritmos circadianos, com potencial para contribuir significativamente com a pesquisa na área. Os experimentos, simulações e análises com bases de dados importadas foram concebidos para gerar dados ideais para testar uma variedade de funcionalidades do CircadiPy, permitindo validar e depurar seus módulos, funções, métodos de objetos, bem como saídas numéricas e gráficas.

Esses exemplos abrangem, de maneira representativa, a maioria das análises e formas de visualização gráfica empregadas por pesquisadores da área. Como exemplo, a Figura 32C reforça a robustez dos parâmetros rítmicos obtidos, o que é corroborado pela visualização do modelo ajustado. Além disso, o algoritmo do CircadiPy converte automaticamente os valores de fase de radianos para horas, facilitando a interpretação biológica dos resultados ao

adaptar a saída numérica da CosinorPy ao formato esperado por pesquisadores da cronobiologia.

Apesar da relativa facilidade de acesso às funções computacionais utilizadas no processamento de sinais, seu uso ainda exige do pesquisador conhecimentos específicos em linguagens de programação, o que muitas vezes pode representar um obstáculo. Uma rápida busca na internet revela algumas soluções gratuitas e de código aberto para análise de dados circadianos, porém com predominância de pacotes desenvolvidos em R (Abhilash & Sheeba, 2019; Cenek et al., 2020), frequentemente voltados à análise de dados moleculares (Hughes et al., 2010; Hutchison et al., 2018; Singer & Hughey, 2019).

Em contraste, nossa proposta baseada em Python visa alcançar escalabilidade, explorando a maior versatilidade da linguagem, sua comunidade ativa e amplo suporte. Entre as soluções existentes em Python, o pacote pyActigraphy (Hammad et al., 2021) se concentra em detecção de sono, actigrafia e exposição à luz, enquanto o per2py (Shan et al., 2020) é voltado à análise de dados de bioluminescência do gene circadiano Per2. Além dessas, opções comerciais incluem o software CLOCKLAB® da Actimetrics, Wilmette, IL.

Nesse cenário, o CircadiPy busca unir ferramentas de visualização de séries temporais e parametrização de atributos rítmicos, oferecendo praticidade para análises cronobiológicas em ambientes laboratoriais com recursos financeiros limitados. Além disso, não há restrições quanto ao tamanho ou resolução do conjunto de dados que alimenta as funções do CircadiPy. Como projeto *open-source*, o CircadiPy incentiva o envolvimento da comunidade (via GitHub), promovendo a expansão contínua das técnicas de análise, gráficos e soluções de processamento de sinal. Em resumo, o projeto está aberto para desenvolvimento futuro, incluindo otimizações e correções, o que reforça seu compromisso com a melhoria contínua e adaptabilidade.

Durante o desenvolvimento de uma biblioteca como o CircadiPy, a escolha da linguagem de programação é um aspecto central. Considerando a necessidade de um software de código aberto voltado à comunidade científica e passível de expansão, o Python é atualmente uma das principais escolhas para aplicações científicas, especialmente quando utilizado em conjunto com

ferramentas como o Jupyter® Notebook, que permite a inclusão de textos explicativos integrados ao código.

Assim como outras linguagens interpretadas, o Python favorece tempos de desenvolvimento reduzidos em comparação com linguagens compiladas amplamente utilizadas, como C/C++, graças à sua sintaxe simples, que por sua vez facilita a incorporação e manutenção de funcionalidades com base no retorno da comunidade (Fangohr, 2004). O interpretador Python é gratuito e está disponível para todas as plataformas, incluindo Windows, Linux e macOS, apresentando uma interface altamente compatível (Ernest et al., 2017). Essas e outras vantagens tornam o Python uma escolha ideal para que programadores e entusiastas colaborem no desenvolvimento de funcionalidades intercambiáveis e bibliotecas dedicadas a resolver os diversos desafios encontrados nas áreas que utilizam programação como ferramenta de desenvolvimento científico.

De maneira semelhante ao abordado na Seção 5 (Discussão) do Capítulo II, as aplicações desenvolvidas no presente Capítulo, também se encaixam dentro dos estudos em epilepsia. De forma geral, é importante não somente analisar as modificações cerebrais causadas pela epilepsia, mas também todas aquelas saídas sistêmicas que se correlacionam diretamente com a progressão da patologia.

É do conhecimento que a epilepsia possui diversas comorbidades, como ansiedade, depressão, estresse, entre outros (Keezer et al., 2016; Mazarati & Sankar, 2016). Além disso, também é estabelecida a relação entre os eventos ictais e o ciclo circadiano, principalmente no que se refere às fases do sono (Baud et al., 2018; Spencer et al., 2016).

As variáveis apresentadas estão correlacionadas de maneira direta ou indireta com as mudanças experimentadas pelo cérebro durante a epileptogênese e as sucessivas crises espontâneas e recorrentes. Logo, é de extremo interesse compreender as atribuições de causa e efeito entre os fenômenos. É nesse contexto que o CircadiPy pode atuar como uma ferramenta de exploração de dados cronobiológicos, revelando atributos inerentes ao comportamento e aos ritmos endógenos que afetam ou são afetados pelos processos epileptogênicos e ictogênicos.

A licença adotada para este software é a GPLv3, que possui uma forte orientação *copyleft* e, entre suas condições, fornece o contexto ideal quando o objetivo é a distribuição e modificação do próprio software, tornando-o naturalmente propenso ao processo de aperfeiçoamento contínuo, característico de projetos que seguem licenças de código aberto.

6. CONCLUSÃO

O CircadiPy representa uma contribuição importante para grupos de pesquisa que necessitam avaliar processos rítmicos, como aqueles relacionados a características cronobiológicas. Nosso objetivo foi disponibilizar à comunidade científica um pacote voltado à análise de séries temporais, oferecendo uma pipeline simples e abrangente, estruturada dentro de um único objeto em Python.

O repositório no GitHub está publicamente disponível para contribuições, download e uso, acompanhado de nossos melhores esforços em fornecer documentação e tutoriais que orientem os usuários interessados. O uso de Jupyter® Notebooks, combinando código Python com explicações em texto, torna a pipeline intuitiva, amigável e facilmente modificável para diferentes aplicações.

REFERÊNCIAS

- Abhilash, L., & Sheeba, V. (2019). RhythmicAlly: Your R and Shiny-Based Open-Source Ally for the Analysis of Biological Rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, 34(5), 551-561.
<https://doi.org/10.1177/0748730419862474>
- Adams-Selin, R. D. (2023). A Three-Dimensional Hail Trajectory Clustering Technique. *Monthly Weather Review*, 151(9), 2361-2375.
<https://doi.org/10.1175/mwr-d-22-0345.1>
- Adrian, E. D., & Zotterman, Y. (1926). The impulses produced by sensory nerve endings: Part 3. Impulses set up by Touch and Pressure. *The Journal of Physiology*, 61(4), 465-483.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1926.sp002308>
- Ahmadi, S., Sasaki, T., Sabariego, M., Leibold, C., Leutgeb, S., & Leutgeb, J. K. (2025). Distinct roles of dentate gyrus and medial entorhinal cortex inputs for phase precession and temporal correlations in the hippocampal CA3 area. *Nature Communications*, 16(1), 13.
<https://doi.org/10.1038/s41467-024-54943-2>
- Ameen, R. W., Warshawski, A., Fu, L., & Antle, M. C. (2022). Early life circadian rhythm disruption in mice alters brain and behavior in adulthood. *Scientific Reports*, 12(1), 7366.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-11335-0>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (Orgs.). (2006). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001>
- Ankerst, M., Breunig, M. M., Kriegel, H.-P., & Sander, J. (1999). OPTICS:

- Ordering points to identify the clustering structure. *ACM SIGMOD Record*, 28(2), 49-60. <https://doi.org/10.1145/304181.304187>
- Arcieri, S., Velotti, R., Noè, F., Carriero, G., Cattalini, A., Galbardi, B., Gnatkovsky, V., & De Curtis, M. (2014). Variable electrobehavioral patterns during focal nonconvulsive status epilepticus induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic acid. *Epilepsia*, 55(12), 1978-1985. <https://doi.org/10.1111/epi.12850>
- Asadzadeh, S., Yousefi Rezaii, T., Beheshti, S., Delpak, A., & Meshgini, S. (2020). A systematic review of EEG source localization techniques and their applications on diagnosis of brain abnormalities. *Journal of Neuroscience Methods*, 339, 108740. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108740>
- Balbinot, G., Milosevic, M., Morshead, C. M., Iwasa, S. N., Zariffa, J., Milosevic, L., Valiante, T. A., Hoffer, J. A., & Popovic, M. R. (2025). The mechanisms of electrical neuromodulation. *The Journal of Physiology*, 603(2), 247-284. <https://doi.org/10.1113/JP286205>
- Bass, D. I., & Manns, J. R. (2015). Memory-enhancing amygdala stimulation elicits gamma synchrony in the hippocampus. *Behavioral Neuroscience*, 129(3), 244-256. <https://doi.org/10.1037/bne0000052>
- Basu, J., Zaremba, J. D., Cheung, S. K., Hitti, F. L., Zemelman, B. V., Losonczy, A., & Siegelbaum, S. A. (2016). Gating of hippocampal activity, plasticity, and memory by entorhinal cortex long-range inhibition. *Science*, 351(6269), aaa5694. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5694>
- Baud, M. O., Kleen, J. K., Mirro, E. A., Andrechak, J. C., King-Stephens, D., Chang, E. F., & Rao, V. R. (2018). Multi-day rhythms modulate seizure

- risk in epilepsy. *Nature Communications*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02577-y>
- Beck, A. (1890). *Oznaczenie lokalizacyi z mozgu i rdzeniu za pomoca zjawisk elektrycznych*.
- Beenhakker, M. P., & Huguenard, J. R. (2009). Neurons that Fire Together Also Conspire Together: Is Normal Sleep Circuitry Hijacked to Generate Epilepsy? *Neuron*, 62(5), 612-632.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.015>
- Beitchman, J. A., Krishna, G., Bromberg, C. E., & Thomas, T. C. (2023). Effects of isoflurane and urethane anesthetics on glutamate neurotransmission in rat brain using in vivo amperometry. *BMC Neuroscience*, 24(1), 52.
<https://doi.org/10.1186/s12868-023-00822-3>
- Berger, H. (1929). Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 87(1), 527-570.
<https://doi.org/10.1007/BF01797193>
- Bertolero, M. A., Yeo, B. T. T., & D'Esposito, M. (2015). The modular and integrative functional architecture of the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(49).
<https://doi.org/10.1073/pnas.1510619112>
- Bertram, E. H. (2013). Neuronal circuits in epilepsy: Do they matter? *Experimental Neurology*, 244, 67-74.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.028>
- Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2),

331-356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>

Borbély, A. A., Steigrad, P., & Tobler, I. (1980). Effect of sleep deprivation on brain serotonin in the rat. *Behavioural Brain Research*, *1*(2), 205-210.

[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(80\)80058-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(80)80058-1)

Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005).

Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, *8*(9), 1263-1268.

<https://doi.org/10.1038/nn1525>

Bray, M. S., Shaw, C. A., Moore, M. W. S., Garcia, R. A. P., Zanutta, M. M.,

Durgan, D. J., Jeong, W. J., Tsai, J.-Y., Bugger, H., Zhang, D.,

Rohrwasser, A., Rennison, J. H., Dyck, J. R. B., Litwin, S. E., Hardin, P.

E., Chow, C.-W., Chandler, M. P., Abel, E. D., & Young, M. E. (2008).

Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function, metabolism, and gene expression.

American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology,

294(2), H1036-H1047. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01291.2007>

Buzsáki, G. (2005). Theta rhythm of navigation: Link between path integration

and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus*,

15(7), 827-840. <https://doi.org/10.1002/hipo.20113>

Buzsáki, G. (2015). Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for

episodic memory and planning. *Hippocampus*, *25*(10), 1073-1188.

<https://doi.org/10.1002/hipo.22488>

Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular

fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews*

Neuroscience, *13*(6), 407-420. <https://doi.org/10.1038/nrn3241>

- Buzsáki, G., & Tingley, D. (2018). Space and Time: The Hippocampus as a Sequence Generator. *Trends in Cognitive Sciences*, 22(10), 853-869. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2018.07.006>
- Cai, F., Wang, K., Zhao, T., Wang, H., Zhou, W., & Hong, B. (2022). BrainQuake: An Open-Source Python Toolbox for the Stereoelectroencephalography Spatiotemporal Analysis. *Frontiers in Neuroinformatics*, 15. <https://doi.org/10.3389/fninf.2021.773890>
- Çalışkan, G., & Stork, O. (2019). Hippocampal network oscillations at the interplay between innate anxiety and learned fear. *Psychopharmacology*, 236(1), 321-338. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5109-z>
- Canto-de-Souza, L., & Mattioli, R. (2016). The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, 130, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.01.012>
- Carriero, G., Arcieri, S., Cattalini, A., Corsi, L., Gnatkovsky, V., & De Curtis, M. (2012). A guinea pig model of mesial temporal lobe epilepsy following nonconvulsive status epilepticus induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic acid. *Epilepsia*, 53(11), 1917-1927. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03669.x>
- Carvalho-Moreira, J. P., De Oliveira Guarnieri, L., Passos, M. C., Emrich, F., Bargi-Souza, P., Peliciari-Garcia, R. A., & Moraes, M. F. D. (2024). CircadiPy: An open-source toolkit for analyzing chronobiology time series. *Journal of Neuroscience Methods*, 411, 110245. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2024.110245>

- Catacuzzeno, L., Michelucci, A., & Franciolini, F. (2024). The Long Journey from Animal Electricity to the Discovery of Ion Channels and the Modelling of the Human Brain. *Biomolecules*, *14*(6), 684.
<https://doi.org/10.3390/biom14060684>
- Caton, R. (1875). The Electric Currents of the Brain. *British Medical Journal*, *2*(765), 278.
- Cenek, L., Klindziuk, L., Lopez, C., McCartney, E., Martin Burgos, B., Tir, S., Harrington, M. E., & Leise, T. L. (2020). CIRCADA: Shiny Apps for Exploration of Experimental and Synthetic Circadian Time Series with an Educational Emphasis. *Journal of Biological Rhythms*, *35*(2), 214-222.
<https://doi.org/10.1177/0748730419900866>
- Chellappa, S. L., Vujovic, N., Williams, J. S., & Scheer, F. A. J. L. (2019). Impact of Circadian Disruption on Cardiovascular Function and Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *30*(10), 767-779.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.07.008>
- Chen, N., Liu, C., Yan, N., Hu, W., Zhang, J., Ge, Y., & Meng, F. (2013). A Macaque Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy Induced by Unilateral Intrahippocampal Injection of Kainic Acid. *PLoS ONE*, *8*(8), e72336.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072336>
- Chen, Y. (2017). Mechanisms of Winner-Take-All and Group Selection in Neuronal Spiking Networks. *Frontiers in Computational Neuroscience*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fncom.2017.00020>
- Choi, W., Cho, J., Lee, S., & Jung, Y. (2020). Fast Constrained Dynamic Time Warping for Similarity Measure of Time Series Data. *IEEE Access*, *8*, 222841-222858. <https://doi.org/10.1109/access.2020.3043839>

- Colwell, C. S., & Foster, R. G. (1992). Photic regulation of Fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 324(2), 135-142.
<https://doi.org/10.1002/cne.903240202>
- Compston, A. (2010). The Berger rhythm: Potential changes from the occipital lobes in man, by E.D. Adrian and B.H.C. Matthews (From the Physiological Laboratory, Cambridge). *Brain* 1934: 57; 355-385. *Brain*, 133(1), 3-6. <https://doi.org/10.1093/brain/awp324>
- Cooley, J. W., & Tukey, J. W. (1965). An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Mathematics of Computation*, 19(90), 297-301.
<https://doi.org/10.1090/S0025-5718-1965-0178586-1>
- Cota, V. R., Cançado, S. A. V., & Moraes, M. F. D. (2023). On temporal scale-free non-periodic stimulation and its mechanisms as an infinite improbability drive of the brain's functional connectogram. *Frontiers in Neuroinformatics*, 17, 1173597.
<https://doi.org/10.3389/fninf.2023.1173597>
- Cota, V. R., De Oliveira, J. C., Damázio, L. C. M., & Moraes, M. F. D. (2021). Nonperiodic stimulation for the treatment of refractory epilepsy: Applications, mechanisms, and novel insights. *Epilepsy & Behavior*, 121, 106609. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106609>
- Cota, V. R., Drabowski, B. M. B., De Oliveira, J. C., & Moraes, M. F. D. (2016). The epileptic amygdala: Toward the development of a neural prosthesis by temporally coded electrical stimulation. *Journal of Neuroscience Research*, 94(6), 463-485. <https://doi.org/10.1002/jnr.23741>
- Cota, V. R., Medeiros, D. D. C., Vilela, M. R. S. D. P., Doretto, M. C., & Moraes,

- M. F. D. (2009). Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylenetetrazole seizure outcome. *Epilepsy & Behavior*, *14*(1), 26-31.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2008.09.006>
- Dahal, P., Rauhala, O. J., Khodagholy, D., & Gelinas, J. N. (2023). Hippocampal-cortical coupling differentiates long-term memory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *120*(7), e2207909120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207909120>
- Dardente, H., Dardente, H., & Cermakian, N. (2007). Molecular Circadian Rhythms in Central and Peripheral Clocks in Mammals. *Chronobiology International*, *24*(2), 195-213.
<https://doi.org/10.1080/07420520701283693>
- Deisseroth, K. (2011). Optogenetics. *Nature Methods*, *8*(1), 26-29.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.f.324>
- Duffy, J. F., & Dijk, D.-J. (2002). Getting Through to Circadian Oscillators: Why Use Constant Routines? *Journal of Biological Rhythms*, *17*(1), 4-13.
<https://doi.org/10.1177/074873002129002294>
- Dzik, J. M., Puścian, A., Mijakowska, Z., Radwanska, K., & Łęski, S. (2018). PyMICE: A Python library for analysis of IntelliCage data. *Behavior Research Methods*, *50*(2), 804-815.
<https://doi.org/10.3758/s13428-017-0907-5>
- Edgar, D., Dement, W., & Fuller, C. (1993). Effect of SCN lesions on sleep in squirrel monkeys: Evidence for opponent processes in sleep-wake regulation. *The Journal of Neuroscience*, *13*(3), 1065-1079.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-03-01065.1993>

- Ehrens, D., Aeed, F., Otor, Y., Charu, V., Razavi, B., Sarma, S. V., Schiller, Y., & Tass, P. A. (2025). Electrical Coordinated Reset stimulation induces network desynchronization in an in vivo model of status epilepticus. *Epilepsy & Behavior*, *165*, 110300.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2025.110300>
- Einevoll, G. T., Kayser, C., Logothetis, N. K., & Panzeri, S. (2013). Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(11), 770-785.
<https://doi.org/10.1038/nrn3599>
- Einthoven, W., Fahr, G., & De Waart, A. (1913). Über die Richtung und die manifeste Grösse der Potentialschwankungen im menschlichen Herzen und über den Einfluss der Herzlage auf die Form des Elektrokardiogramms. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, *150*(6-8), 275-315.
<https://doi.org/10.1007/bf01697566>
- Ekhart, D., Wicht, H., Kersken, T., Ackermann, H., Kaczmarczyk, M., Pretzsch, G., Alexander, H., & Korf, H. (2018). Dynamics of core body temperature cycles in long-term measurements under real life conditions in women. *Chronobiology International*, *35*(1), 8-23.
<https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1375942>
- Engel, J. (2001). Mesial Temporal Lobe Epilepsy: What Have We Learned? *The Neuroscientist*, *7*(4), 340-352.
<https://doi.org/10.1177/107385840100700410>
- Engel Jr, J. (2011). Biomarkers in Epilepsy: Introduction. *Biomarkers in Medicine*, *5*(5), 537-544. <https://doi.org/10.2217/bmm.11.62>

Enright, J. T. (1965). The search for rhythmicity in biological time-series. *Journal of Theoretical Biology*, 8(3), 426-468.

[https://doi.org/10.1016/0022-5193\(65\)90021-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(65)90021-4)

Ernest, A., Mensah, E., & Gilbert, A. (2017). Qualitative Assessment of Compiled, Interpreted and Hybrid Programming Languages. *Communications on Applied Electronics*, 7(7), 8-13.

<https://doi.org/10.5120/cae2017652685>

Fangohr, H. (2004). A Comparison of C, MATLAB, and Python as Teaching Languages in Engineering. Em M. Bubak, G. D. Van Albada, P. M. A. Sloot, & J. Dongarra (Orgs.), *Computational Science—ICCS 2004* (Vol. 3039, p. 1210-1217). Springer Berlin Heidelberg.

https://doi.org/10.1007/978-3-540-25944-2_157

Fernandes, P., Pereira, L. D. M., Horta, N. A. C., Cardoso, T. S. R., Coimbra, C. C., Szawka, R. E., Pereira, G. S., & Poletini, M. O. (2021). Social interaction masking contributes to changes in the activity of the suprachiasmatic nucleus and impacts on circadian rhythms. *Physiology & Behavior*, 237, 113420. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113420>

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482.

<https://doi.org/10.1111/epi.12550>

Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., &

- Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, *58*(4), 522-530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
- Fisher, R. S., & Schachter, S. C. (2000). The Postictal State: A Neglected Entity in the Management of Epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, *1*(1), 52-59. <https://doi.org/10.1006/ebeh.2000.0023>
- Fisher, R., Salanova, V., Witt, T., Worth, R., Henry, T., Gross, R., Oommen, K., Osorio, I., Nazzaro, J., Labar, D., Kaplitt, M., Sperling, M., Sandok, E., Neal, J., Handforth, A., Stern, J., DeSalles, A., Chung, S., Shetter, A., ... the SANTE Study Group. (2010). Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsia*, *51*(5), 899-908. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02536.x>
- Fourier, J. B. J. (1822). *Mémoire sur la propagation de la chaleur*.
- Foutz, T. J., & Wong, M. (2022). Brain stimulation treatments in epilepsy: Basic mechanisms and clinical advances. *Biomedical Journal*, *45*(1), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.08.010>
- Frauscher, B., Bartolomei, F., Baud, M. O., Smith, R. J., Worrell, G., & Lundstrom, B. N. (2023). Stimulation to probe, excite, and inhibit the epileptic brain. *Epilepsia*, *64*(S3). <https://doi.org/10.1111/epi.17640>
- Freeman, W. J. (2000). Mesoscopic neurodynamics: From neuron to brain. *Journal of Physiology-Paris*, *94*(5-6), 303-322. [https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(00\)01090-1](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(00)01090-1)
- Galvani, L. (1791). *Aloysii Galvani De viribus electricitatis in motu musculari commentarius*. Ex Typographia Institutii Scientiarum.

<https://doi.org/10.5479/sil.324681.39088000932442>

- García, F., Torres, M.-J., Chacana-Véliz, L., Espinosa, N., El-Deredy, W., Fuentealba, P., & Negrón-Oyarzo, I. (2025). Prefrontal cortex synchronization with the hippocampus and parietal cortex is strategy-dependent during spatial learning. *Communications Biology*, 8(1), 79. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07486-1>
- Geiger, B. M., Frank, L. E., Caldera-Siu, A. D., & Pothos, E. N. (2008). Survivable Stereotaxic Surgery in Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, 20, 880. <https://doi.org/10.3791/880>
- Girard, P., Hupé, J. M., & Bullier, J. (2001). Feedforward and Feedback Connections Between Areas V1 and V2 of the Monkey Have Similar Rapid Conduction Velocities. *Journal of Neurophysiology*, 85(3), 1328-1331. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.3.1328>
- Grech, R., Cassar, T., Muscat, J., Camilleri, K. P., Fabri, S. G., Zervakis, M., Xanthopoulos, P., Sakkalis, V., & Vanrumste, B. (2008). Review on solving the inverse problem in EEG source analysis. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, 5(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1743-0003-5-25>
- Grishman, A., Scherlis, L., & Lasser, R. P. (1953). Spatial vectorcardiography. *The American Journal of Medicine*, 14(2), 184-200. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(53\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(53)90018-7)
- Hackel, L. M., Larson, G. M., Bowen, J. D., Ehrlich, G. A., Mann, T. C., Middlewood, B., Roberts, I. D., Eyink, J., Fetterolf, J. C., Gonzalez, F., Garrido, C. O., Kim, J., O'Brien, T. C., O'Malley, E. E., Mesquita, B., & Barrett, L. F. (2016). On the neural implausibility of the modular mind:

Evidence for distributed construction dissolves boundaries between perception, cognition, and emotion. *Behavioral and Brain Sciences*, 39, e246. <https://doi.org/10.1017/S0140525X15002770>

Halberg, F., Tong, Y. L., & Johnson, E. A. (1967). Circadian System Phase—An Aspect of Temporal Morphology; Procedures and Illustrative Examples. Em H. Von Mayersbach (Org.), *The Cellular Aspects of Biorhythms* (p. 20-48). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-88394-1_2

Hammad, G., Reyt, M., Belyi, N., Baillet, M., Deantoni, M., Lesoinne, A., Muto, V., & Schmidt, C. (2021). pyActigraphy: Open-source python package for actigraphy data visualization and analysis. *PLOS Computational Biology*, 17(10), e1009514. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009514>

Hebb, D. O. (2002). *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. L. Erlbaum Associates.

Heck, C. N., King-Stephens, D., Massey, A. D., Nair, D. R., Jobst, B. C., Barkley, G. L., Salanova, V., Cole, A. J., Smith, M. C., Gwinn, R. P., Skidmore, C., Van Ness, P. C., Bergey, G. K., Park, Y. D., Miller, I., Geller, E., Rutecki, P. A., Zimmerman, R., Spencer, D. C., ... Morrell, M. J. (2014). Two-year seizure reduction in adults with medically intractable partial onset epilepsy treated with responsive neurostimulation: Final results of the RNS System Pivotal trial. *Epilepsia*, 55(3), 432-441.
<https://doi.org/10.1111/epi.12534>

Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1939). Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature*, 144(3651), 710-711.
<https://doi.org/10.1038/144710a0>

- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, *117*(4), 500-544.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- Huang, W., Ramsey, K. M., Marcheva, B., & Bass, J. (2011). Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(6), 2133-2141. <https://doi.org/10.1172/JCI46043>
- Hughes, M. E., Abruzzi, K. C., Allada, R., Anafi, R., Arpat, A. B., Asher, G., Baldi, P., De Bekker, C., Bell-Pedersen, D., Blau, J., Brown, S., Ceriani, M. F., Chen, Z., Chiu, J. C., Cox, J., Crowell, A. M., DeBruyne, J. P., Dijk, D.-J., DiTacchio, L., ... Hogenesch, J. B. (2017). Guidelines for Genome-Scale Analysis of Biological Rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, *32*(5), 380-393. <https://doi.org/10.1177/0748730417728663>
- Hughes, M. E., Hogenesch, J. B., & Kornacker, K. (2010). JTK_CYCLE: An Efficient Nonparametric Algorithm for Detecting Rhythmic Components in Genome-Scale Data Sets. *Journal of Biological Rhythms*, *25*(5), 372-380. <https://doi.org/10.1177/0748730410379711>
- Hutchison, A. L., Allada, R., & Dinner, A. R. (2018). Bootstrapping and Empirical Bayes Methods Improve Rhythm Detection in Sparsely Sampled Data. *Journal of Biological Rhythms*, *33*(4), 339-349.
<https://doi.org/10.1177/0748730418789536>
- Intan Technologies (2023). *RHD2000 Series Digital Electrophysiology Interface Chips*. Intan Technologies.
https://intantech.com/files/Intan_RHD2000_series_datasheet.pdf
- Jellinger, K. A. (2011). Niedermeyer's Electroencephalography: Basic

Principles, Clinical Applications, and Related Fields, 6th edn. *European Journal of Neurology*, 18(9), e126-e126.

<https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03406.x>

Jirsa, V. K., Stacey, W. C., Quilichini, P. P., Ivanov, A. I., & Bernard, C. (2014).

On the nature of seizure dynamics. *Brain*, 137(8), 2210-2230.

<https://doi.org/10.1093/brain/awu133>

Josselyn, S. A., & Tonegawa, S. (2020). Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, 367(6473), eaaw4325.

<https://doi.org/10.1126/science.aaw4325>

Kajikawa, Y., & Schroeder, C. E. (2011). How Local Is the Local Field Potential?

Neuron, 72(5), 847-858. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.029>

Kandel, A., & Buzsáki, G. (1997). Cellular-Synaptic Generation of Sleep

Spindles, Spike-and-Wave Discharges, and Evoked Thalamocortical Responses in the Neocortex of the Rat. *The Journal of Neuroscience*, 17(17), 6783-6797.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-17-06783.1997>

Kandel, E. R. (Org.). (2013). *Principles of neural science* (5th ed). McGraw-Hill.

Kandratavicius, L., Balista, P., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R., Umeoka, E.,

Garcia-Cairasco, N., Bueno-Junior, L., & Leite, J. (2014). Animal models of epilepsy: Use and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 1693. <https://doi.org/10.2147/NDT.S50371>

Karashima, A., Katayama, N., & Nakao, M. (2010). Enhancement of

Synchronization Between Hippocampal and Amygdala Theta Waves Associated With Pontine Wave Density. *Journal of Neurophysiology*, 103(5), 2318-2325. <https://doi.org/10.1152/jn.00551.2009>

- Katz, R. (2004). Biomarkers and surrogate markers: An FDA perspective. *NeuroRX*, 1(2), 189-195. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.189>
- Keezer, M. R., Sisodiya, S. M., & Sander, J. W. (2016). Comorbidities of epilepsy: Current concepts and future perspectives. *The Lancet Neurology*, 15(1), 106-115. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(15\)00225-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(15)00225-2)
- Klajman, A., Sherf, L., & Kauli, N. (1963). The Normal vectorcardiogram. *The American Journal of Cardiology*, 11(2), 187-193. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(63\)90059-6](https://doi.org/10.1016/0002-9149(63)90059-6)
- König, P., Engel, A. K., & Singer, W. (1996). Integrator or coincidence detector? The role of the cortical neuron revisited. *Trends in Neurosciences*, 19(4), 130-137. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)80019-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)80019-1)
- Krook-Magnuson, E., Armstrong, C., Oijala, M., & Soltesz, I. (2013). On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nature Communications*, 4(1), 1376. <https://doi.org/10.1038/ncomms2376>
- Krook-Magnuson, E., Gelinas, J. N., Soltesz, I., & Buzsáki, G. (2015). Neuroelectronics and Biooptics: Closed-Loop Technologies in Neurological Disorders. *JAMA Neurology*, 72(7), 823. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0608>
- Law, S. (2019). STUMPY: A Powerful and Scalable Python Library for Time Series Data Mining. *Journal of Open Source Software*, 4(39), 1504. <https://doi.org/10.21105/joss.01504>
- Le Duigou, C., Bouilleret, V., & Miles, R. (2008). Epileptiform activities in slices of hippocampus from mice after intra-hippocampal injection of kainic

- acid. *The Journal of Physiology*, 586(20), 4891-4904.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.156281>
- LeDoux, J. (1998). Fear and the brain: Where have we been, and where are we going? *Biological Psychiatry*, 44(12), 1229-1238.
[https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00282-0](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00282-0)
- LeDoux, J. (1998). *The Emotional Brain: The Mysterious Underpinnings of Emotional Life*. Simon & Schuster.
- LeDoux, J. (2003). The Emotional Brain, Fear, and the Amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(4/5), 727-738.
<https://doi.org/10.1023/A:1025048802629>
- Lee, J.-G., Han, J., & Whang, K.-Y. (2007). Trajectory clustering: A partition-and-group framework. *Proceedings of the 2007 ACM SIGMOD international conference on Management of data*, 593-604.
<https://doi.org/10.1145/1247480.1247546>
- Lévesque, M., & Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(10), 2887-2899.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.10.011>
- Lloyd, S. (1982). Least squares quantization in PCM. *IEEE Transactions on Information Theory*, 28(2), 129-137.
<https://doi.org/10.1109/tit.1982.1056489>
- Lomb, N. R. (1976). Least-squares frequency analysis of unequally spaced data. *Astrophysics and Space Science*, 39(2), 447-462.
<https://doi.org/10.1007/BF00648343>
- Maggu, A. R., Yu, Y., & Overath, T. (2024). The click-evoked auditory brainstem response is not affected in auditory processing disorder: A meta-analysis

- systematic review. *Frontiers in Audiology and Otology*, 2, 1369716.
<https://doi.org/10.3389/fauot.2024.1369716>
- Maren, S., Phan, K. L., & Liberzon, I. (2013). The contextual brain: Implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 417-428. <https://doi.org/10.1038/nrn3492>
- Matsumoto, R., Kunieda, T., & Nair, D. (2017). Single pulse electrical stimulation to probe functional and pathological connectivity in epilepsy. *Seizure*, 44, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.11.003>
- Mazarati, A., & Sankar, R. (2016). Common Mechanisms Underlying Epileptogenesis and the Comorbidities of Epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(7), a022798.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022798>
- McDonald, A. J., & Mott, D. D. (2017). Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. *Journal of Neuroscience Research*, 95(3), 797-820.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23709>
- McHugh, T. J., & Tonegawa, S. (2007). Spatial exploration is required for the formation of contextual fear memory. *Behavioral Neuroscience*, 121(2), 335-339. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.2.335>
- Medeiros, D. C., Oliveira, L. B., Mourão, F. A. G., Bastos, C. P., Cairasco, N. G., Pereira, G. S., Mendes, E. M. A. M., & Moraes, M. F. D. (2014). Temporal Rearrangement of Pre-ictal PTZ Induced Spike Discharges by Low Frequency Electrical Stimulation to the Amygdaloid Complex. *Brain Stimulation*, 7(2), 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2013.11.005>
- Medeiros, D. C., Raspante, L. B. P., Mourão, F. A. G., Carvalho, V. R., Mendes,

- E. M. A. M., & Moraes, M. F. D. (2018). Deep brain stimulation probing performance is enhanced by pairing stimulus with epileptic seizure. *Epilepsy & Behavior*, *88*, 380-387.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.09.048>
- Meijer, J. H., & Rietveld, W. J. (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiological Reviews*, *69*(3), 671-707.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.3.671>
- Mesquita, M. B. S., De Castro Medeiros, D., Cota, V. R., Richardson, M. P., Williams, S., & Moraes, M. F. D. (2011). Distinct temporal patterns of electrical stimulation influence neural recruitment during PTZ infusion: An fMRI study. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *105*(1-2), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.10.005>
- Messier, C., Émond, S., & Ethier, K. (1999). New Techniques in Stereotaxic Surgery and Anesthesia in the Mouse. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *63*(2), 313-318.
[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(98\)00247-0](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(98)00247-0)
- Monteiro, Á. B., Alves, A. F., Ribeiro Portela, A. C., Oliveira Pires, H. F., Pessoa De Melo, M., Medeiros Vilar Barbosa, N. M., & Bezerra Felipe, C. F. (2024). Pentylentetrazole: A review. *Neurochemistry International*, *180*, 105841. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105841>
- Montemurro, M. A., Rasch, M. J., Murayama, Y., Logothetis, N. K., & Panzeri, S. (2008). Phase-of-Firing Coding of Natural Visual Stimuli in Primary Visual Cortex. *Current Biology*, *18*(5), 375-380.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.023>
- Moore-Ede, M. C., Sulzman, F. M., & Fuller, C. A. (1982). *The clocks that time*

us: *Physiology of the circadian timing system*. Harvard Univ. Press.

Moraes, M. F. D., Del Vecchio, F., Terra, V. C., & Garcia-Cairasco, N. (2000).

Time evolution of acoustic 'information' processing in the mesencephalon of Wistar rats. *Neuroscience Letters*, *284*(1-2), 13-16.

[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)00978-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)00978-2)

Moraes, M. F. D., & Garcia-Cairasco, N. (2001). Real time mapping of rat

midbrain neural circuitry using auditory evoked potentials. *Hearing Research*, *161*(1-2), 35-44.

[https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(01\)00341-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(01)00341-0)

Moraes, M. F. D., Mishra, P. K., Jobe, P. C., & Garcia-Cairasco, N. (2005). An

electrographic analysis of the synchronous discharge patterns of GEPR-9s generalized seizures. *Brain Research*, *1046*(1-2), 1-9.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.03.035>

Moreira, J. P. C., Carvalho, V. R., Mendes, E. M. A. M., Fallah, A., Sejnowski, T.

J., Lainscsek, C., & Comstock, L. (2025). An open-access EEG dataset for speech decoding: Exploring the role of articulation and coarticulation.

Scientific Data, *12*(1), 1017. <https://doi.org/10.1038/s41597-025-05187-2>

Moškon, M. (2020). CosinorPy: A python package for cosinor-based

rhythmometry. *BMC Bioinformatics*, *21*(1), 485.

<https://doi.org/10.1186/s12859-020-03830-w>

Mourão, F. A. G., Guarnieri, L. de O., Amaral Júnior, P. A., Carvalho, V. R.,

Mendes, E. M. A. M., & Moraes, M. F. D. (2022). A Fully Adapted Headstage With Custom Electrode Arrays Designed for

Electrophysiological Experiments. *Frontiers in Neuroscience*, *15*.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.691788>

- Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, *260*(5554), 799-802. <https://doi.org/10.1038/260799a0>
- Newman, J. P., Zeller-Townson, R., Fong, M.-F., Arcot Desai, S., Gross, R. E., & Potter, S. M. (2013). Closed-Loop, Multichannel Experimentation Using the Open-Source NeuroRighter Electrophysiology Platform. *Frontiers in Neural Circuits*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00098>
- Ogren, J. A., Wilson, C. L., Bragin, A., Lin, J. J., Salamon, N., Dutton, R. A., Luders, E., Fields, T. A., Fried, I., Toga, A. W., Thompson, P. M., Engel, J., & Staba, R. J. (2009). Three-dimensional surface maps link local atrophy and fast ripples in human epileptic hippocampus. *Annals of Neurology*, *66*(6), 783-791. <https://doi.org/10.1002/ana.21703>
- O'Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, *51*(1), 78-109. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90055-8)
- Pan, X., Mota, S., & Zhang, B. (2020). Circadian Clock Regulation on Lipid Metabolism and Metabolic Diseases. Em X.-C. Jiang (Org.), *Lipid Transfer in Lipoprotein Metabolism and Cardiovascular Disease* (Vol. 1276, p. 53-66). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6082-8_5
- Parvizi, J., & Kastner, S. (2018). Promises and limitations of human intracranial electroencephalography. *Nature Neuroscience*, *21*(4), 474-483. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0108-2>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition* (7th ed). Elsevier Science.

- Paz, J. T., & Huguenard, J. R. (2015). Microcircuits and their interactions in epilepsy: Is the focus out of focus? *Nature Neuroscience*, *18*(3), 351-359. <https://doi.org/10.1038/nn.3950>
- Peliciari-Garcia, R. A., Goel, M., Aristorenas, J. A., Shah, K., He, L., Yang, Q., Shalev, A., Bailey, S. M., Prabhu, S. D., Chatham, J. C., Gamble, K. L., & Young, M. E. (2016). Altered myocardial metabolic adaptation to increased fatty acid availability in cardiomyocyte-specific CLOCK mutant mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1861*(10), 1579-1595. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.012>
- Penfield, W., & Boldrey, E. (1937). SOMATIC MOTOR AND SENSORY REPRESENTATION IN THE CEREBRAL CORTEX OF MAN AS STUDIED BY ELECTRICAL STIMULATION. *Brain*, *60*(4), 389-443. <https://doi.org/10.1093/brain/60.4.389>
- Penfield, W., & Rasmussen, T. (1950). The Cerebral Cortex of Man: A Clinical Study of Localization of Function. *Journal of the American Medical Association*, *144*(16), 1412. <https://doi.org/10.1001/jama.1950.02920160086033>
- Pessoa, L. (2008). On the relationship between emotion and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(2), 148-158. <https://doi.org/10.1038/nrn2317>
- Petersen, P. C., & Buzsáki, G. (2020). Cooling of Medial Septum Reveals Theta Phase Lag Coordination of Hippocampal Cell Assemblies. *Neuron*, *107*(4), 731-744.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.05.023>
- Pfeffer, M., Wicht, H., Von Gall, C., & Korf, H.-W. (2015). Owls and Larks in Mice. *Frontiers in Neurology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00101>

- Piccolino, M. (1997). Luigi Galvani and animal electricity: Two centuries after the foundation of electrophysiology. *Trends in Neurosciences*, *20*(10), 443-448. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01101-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01101-6)
- Pinto, H. P. P., Carvalho, V. R., Medeiros, D. D. C., Almeida, A. F. S., Mendes, E. M. A. M., & Moraes, M. F. D. (2017). Auditory processing assessment suggests that Wistar audiogenic rat neural networks are prone to entrainment. *Neuroscience*, *347*, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.043>
- Pitkänen, A., & Lukasiuk, K. (2011). Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet Neurology*, *10*(2), 173-186. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(10\)70310-0](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70310-0)
- Pizarro, A., Hayer, K., Lahens, N. F., & Hogenesch, J. B. (2012). CircaDB: A database of mammalian circadian gene expression profiles. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D1009-D1013. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1161>
- Pottkämper, J. C. M., Hofmeijer, J., Van Waarde, J. A., & Van Putten, M. J. A. M. (2020). The postictal state—What do we know? *Epilepsia*, *61*(6), 1045-1061. <https://doi.org/10.1111/epi.16519>
- Quitadamo, L. R., Foley, E., Mai, R., De Palma, L., Specchio, N., & Seri, S. (2018). EPINETLAB: A Software for Seizure-Onset Zone Identification From Intracranial EEG Signal in Epilepsy. *Frontiers in Neuroinformatics*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fninf.2018.00045>
- Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *32*(3), 281-294. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)

- Raedt, R., Van Dycke, A., Van Melkebeke, D., De Smedt, T., Claeys, P., Wyckhuys, T., Vonck, K., Wadman, W., & Boon, P. (2009). Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: Characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta Neurologica Scandinavica*, *119*(5), 293-303.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01108.x>
- Reddy, L., Self, M. W., Zoefel, B., Poncet, M., Possel, J. K., Peters, J. C., Baayen, J. C., Idema, S., VanRullen, R., & Roelfsema, P. R. (2021). Theta-phase dependent neuronal coding during sequence learning in human single neurons. *Nature Communications*, *12*(1), 4839.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-25150-0>
- Reinhart, R. M. G. (2022). Synchronizing neural rhythms. *Science*, *377*(6606), 588-589. <https://doi.org/10.1126/science.add4834>
- Rodrigues, S. M. A. F., & R. Cota, V. (2024). SynchroLINNce: Toolbox for Neural Synchronization and Desynchronization Assessment in Epilepsy Animal Models. *International Journal of Psychological Research*, *17*(2), 14-24.
<https://doi.org/10.21500/20112084.7329>
- Ross, J. M., & Hamm, J. P. (2020). Cortical Microcircuit Mechanisms of Mismatch Negativity and Its Underlying Subcomponents. *Frontiers in Neural Circuits*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.00013>
- Rusina, E., Bernard, C., & Williamson, A. (2021). The Kainic Acid Models of Temporal Lobe Epilepsy. *Eneuro*, *8*(2), ENEURO.0337-20.2021.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0337-20.2021>
- Sah, P., Faber, E. S. L., Lopez De Armentia, M., & Power, J. (2003). The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiological Reviews*,

- 83(3), 803-834. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2003>
- Scharfman, H. E. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 7(4), 348-354.
<https://doi.org/10.1007/s11910-007-0053-z>
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512-521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- Schuster, A. (1898). On the investigation of hidden periodicities with application to a supposed 26 day period of meteorological phenomena. *Terrestrial Magnetism*, 3(1), 13-41. <https://doi.org/10.1029/TM003i001p00013>
- Seidenbecher, T., Laxmi, T. R., Stork, O., & Pape, H.-C. (2003). Amygdalar and Hippocampal Theta Rhythm Synchronization During Fear Memory Retrieval. *Science*, 301(5634), 846-850.
<https://doi.org/10.1126/science.1085818>
- Serin, Y., & Acar Tek, N. (2019). Effect of Circadian Rhythm on Metabolic Processes and the Regulation of Energy Balance. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(4), 322-330. <https://doi.org/10.1159/000500071>
- Shan, Y., Abel, J. H., Li, Y., Izumo, M., Cox, K. H., Jeong, B., Yoo, S.-H., Olson, D. P., Doyle, F. J., & Takahashi, J. S. (2020). Dual-Color Single-Cell Imaging of the Suprachiasmatic Nucleus Reveals a Circadian Role in Network Synchrony. *Neuron*, 108(1), 164-179.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.012>

- Shatz, C. J. (1992). The Developing Brain. *Scientific American*, 267(3), 60-67.
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0992-60>
- Sherrington, C. S. (1906). *The Integrative Action of the Nervous System*. Yale University Press.
- Shimba, A., & Ikuta, K. (2020). Glucocorticoids Regulate Circadian Rhythm of Innate and Adaptive Immunity. *Frontiers in Immunology*, 11, 2143.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02143>
- Shivshankar, P., Fekry, B., Eckel-Mahan, K., & Wetsel, R. A. (2020). Circadian Clock and Complement Immune System—Complementary Control of Physiology and Pathology? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 418. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00418>
- Siegle, J. H., Hale, G. J., Newman, J. P., & Voigts, J. (2015). Neural ensemble communities: Open-source approaches to hardware for large-scale electrophysiology. *Current Opinion in Neurobiology*, 32, 53-59.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.11.004>
- Siegle, J. H., López, A. C., Patel, Y. A., Abramov, K., Ohayon, S., & Voigts, J. (2017). Open Ephys: An open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology. *Journal of Neural Engineering*, 14(4), 045003. <https://doi.org/10.1088/1741-2552/aa5eea>
- Silver, N. R. G., Ward-Flanagan, R., & Dickson, C. T. (2021). Long-term stability of physiological signals within fluctuations of brain state under urethane anesthesia. *PLOS ONE*, 16(10), e0258939.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258939>
- Singer, J. M., & Hughey, J. J. (2019). LimoRhyde: A Flexible Approach for Differential Analysis of Rhythmic Transcriptome Data. *Journal of*

Biological Rhythms, 34(1), 5-18.

<https://doi.org/10.1177/0748730418813785>

Song, J. (2023). Amygdala activity and amygdala-hippocampus connectivity: Metabolic diseases, dementia, and neuropsychiatric issues. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 114647.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114647>

Soper, C., Wicker, E., Kulick, C. V., N'Gouemo, P., & Forcelli, P. A. (2016).

Optogenetic activation of superior colliculus neurons suppresses seizures originating in diverse brain networks. *Neurobiology of Disease*, 87, 102-115. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.12.012>

Spencer, D. C., Sun, F. T., Brown, S. N., Jobst, B. C., Fountain, N. B., Wong, V.

S. S., Mirro, E. A., & Quigg, M. (2016). Circadian and ultradian patterns of epileptiform discharges differ by seizure-onset location during long-term ambulatory intracranial monitoring. *Epilepsia*, 57(9), 1495-1502. <https://doi.org/10.1111/epi.13455>

Squire, L. R., Stark, C. E. L., & Clark, R. E. (2004). The Medial Temporal Lobe.

Annual Review of Neuroscience, 27(1), 279-306.

<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130>

Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1991). The Medial Temporal Lobe Memory System. *Science*, 253(5026), 1380-1386.

<https://doi.org/10.1126/science.1896849>

Staba, R. J., & Bragin, A. (2011). High-frequency Oscillations and Other Electrophysiological Biomarkers of Epilepsy: Underlying Mechanisms. *Biomarkers in Medicine*, 5(5), 545-556.

<https://doi.org/10.2217/bmm.11.72>

- Stead, M., Bower, M., Brinkmann, B. H., Lee, K., Marsh, W. R., Meyer, F. B., Litt, B., Van Gompel, J., & Worrell, G. A. (2010). Microseizures and the spatiotemporal scales of human partial epilepsy. *Brain*, *133*(9), 2789-2797. <https://doi.org/10.1093/brain/awq190>
- Steinmetz, N. A., Aydin, C., Lebedeva, A., Okun, M., Pachitariu, M., Bauza, M., Beau, M., Bhagat, J., Böhm, C., Broux, M., Chen, S., Colonell, J., Gardner, R. J., Karsh, B., Kloosterman, F., Kostadinov, D., Mora-Lopez, C., O'Callaghan, J., Park, J., ... Harris, T. D. (2021). Neuropixels 2.0: A miniaturized high-density probe for stable, long-term brain recordings. *Science*, *372*(6539), eabf4588. <https://doi.org/10.1126/science.abf4588>
- Steinmetz, N. A., Koch, C., Harris, K. D., & Carandini, M. (2018). Challenges and opportunities for large-scale electrophysiology with Neuropixels probes. *Current Opinion in Neurobiology*, *50*, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.01.009>
- Stenvers, D. J., Scheer, F. A. J. L., Schrauwen, P., La Fleur, S. E., & Kalsbeek, A. (2019). Circadian clocks and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*, *15*(2), 75-89. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0122-1>
- Stepan, J., Dine, J., Fenzl, T., Polta, S. A., Von Wolff, G., Wotjak, C. T., & Eder, M. (2012). Entorhinal theta-frequency input to the dentate gyrus trisynaptically evokes hippocampal CA1 LTP. *Frontiers in Neural Circuits*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00064>
- Steriade, M. (2006). Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience*, *137*(4), 1087-1106. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.029>
- Stieve, B. J., Richner, T. J., Krook-Magnuson, C., Netoff, T. I., &

- Krook-Magnuson, E. (2023). Optimization of closed-loop electrical stimulation enables robust cerebellar-directed seizure control. *Brain*, *146*(1), 91-108. <https://doi.org/10.1093/brain/awac051>
- Sundrani, S., Johnson, G. W., Doss, D. J., Makhoul, G. S., Hidalgo Monroy Lerma, B., Reda, A., Cavender, A. C., Liao, E., Rogers, B. P., Williams Roberson, S., Bick, S. K., Morgan, V. L., & Englot, D. J. (2025). Deep learning on brief interictal intracranial recordings can accurately characterize seizure onset zones. *Epilepsia*. <https://doi.org/10.1111/epi.18478>
- Texas Instruments Incorporated (2023). *ADS129x Low-Power, 8-Channel, 24-Bit Analog Front-End for Biopotential Measurements*. Texas Instruments Incorporated. <https://www.ti.com/lit/ds/symlink/ads1296r.pdf>
- Thosar, S. S., Butler, M. P., & Shea, S. A. (2018). Role of the circadian system in cardiovascular disease. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(6), 2157-2167. <https://doi.org/10.1172/JCI80590>
- Tousseyn, S., Dupont, P., Goffin, K., Sunaert, S., & Van Paesschen, W. (2014). Sensitivity and Specificity of Interictal EEG-fMRI for Detecting the Ictal Onset Zone at Different Statistical Thresholds. *Frontiers in Neurology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00131>
- Uktveris, T., & Jusas, V. (2018). Development of a Modular Board for EEG Signal Acquisition. *2018 5th International Conference on Mathematics and Computers in Sciences and Industry (MCSI)*, 95-101. <https://doi.org/10.1109/MCSI.2018.00030>
- Varela, F., Lachaux, J.-P., Rodriguez, E., & Martinerie, J. (2001). The brainweb: Phase synchronization and large-scale integration. *Nature Reviews*

- Neuroscience*, 2(4), 229-239. <https://doi.org/10.1038/35067550>
- Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 25(2), 85-93.
- Ward-Flanagan, R., Pagliardini, S., & Dickson, C. T. (2024). Urethane provides an unparalleled anaesthetic model for natural sleep: Commentary on Mondino et al., 2022. *European Journal of Neuroscience*, 59(4), 478-480. <https://doi.org/10.1111/ejn.15985>
- Wicht, H., Korf, H.-W., Ackermann, H., Ekhardt, D., Fischer, C., & Pfeffer, M. (2014). Chronotypes and rhythm stability in mice. *Chronobiology International*, 31(1), 27-36. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.820739>
- Wilson, F. N., Macleod, A. G., & Barker, P. S. (1933). The Distribution Of The Action Currents Produced By Heart Muscle And Other Excitable Tissues Immersed In Extensive Conducting Media. *Journal of General Physiology*, 16(3), 423-456. <https://doi.org/10.1085/jgp.16.3.423>
- Woldman, W., Schmidt, H., Abela, E., Chowdhury, F. A., Pawley, A. D., Jewell, S., Richardson, M. P., & Terry, J. R. (2020). Dynamic network properties of the interictal brain determine whether seizures appear focal or generalised. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63430-9>
- World Health Organization (2019). *Epilepsy: A public health imperative*. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/325293>
- Wu, W., Gong, X., Qin, Z., & Wang, Y. (2025). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to the pathogenesis of

neurodegenerative diseases—An update. *Acta Pharmacologica Sinica*.

<https://doi.org/10.1038/s41401-025-01576-w>

Yagishita, H., Nishimura, Y., Noguchi, A., Shikano, Y., Ikegaya, Y., & Sasaki, T.

(2020). Urethane anesthesia suppresses hippocampal subthreshold activity and neuronal synchronization. *Brain Research*, 1749, 147137.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147137>

Yang, H., Shan, W., Zhu, F., Yu, T., Fan, J., Guo, A., Li, F., Yang, X., & Wang, Q.

(2019). C-Fos mapping and EEG characteristics of multiple mice brain regions in pentylenetetrazol-induced seizure mice model. *Neurological Research*, 41(8), 749-761.

<https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1610839>

Yang, J., Liu, Y., Ma, L., & Ji, C. (2022). Maritime traffic flow clustering analysis

by density based trajectory clustering with noise. *Ocean Engineering*, 249, 111001. <https://doi.org/10.1016/j.oceaneng.2022.111001>

Young, M. E., Brewer, R. A., Peliciari-Garcia, R. A., Collins, H. E., He, L., Birky,

T. L., Peden, B. W., Thompson, E. G., Ammons, B.-J., Bray, M. S.,

Chatham, J. C., Wende, A. R., Yang, Q., Chow, C.-W., Martino, T. A., &

Gamble, K. L. (2014). Cardiomyocyte-Specific BMAL1 Plays Critical

Roles in Metabolism, Signaling, and Maintenance of Contractile Function of the Heart. *Journal of Biological Rhythms*, 29(4), 257-276.

<https://doi.org/10.1177/0748730414543141>

ANEXO I - Descrições Estatísticas Complementares

Tabela A1 - Resumo dos valores das Figura 11B.

Canal	N	1° ponto de inflexão (ms)		1° pico positivo (ms)		p (FDR-BH)
		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
HL1	864	11,113	0,956	21,539	8,070	0,036
HL2	864	11,036	0,792	21,813	8,034	0,026
HL3	864	11,250	1,139	21,517	8,087	0,049
HL4	864	11,188	1,048	20,819	5,673	0,026
HL5	864	11,120	0,916	20,952	6,027	0,032
HL6	864	11,345	1,227	21,569	7,313	0,009
HL7	864	11,376	1,286	23,004	10,423	0,001
HL8	864	11,201	1,112	24,200	7,690	0,026
HR1	864	11,063	0,920	22,487	7,451	0,017
HR2	864	11,127	0,910	23,537	7,517	0,008
HR3	864	11,207	1,068	23,425	8,029	0,002
HR4	864	11,273	1,050	22,539	6,472	0,027
HR5	864	11,163	0,997	23,322	7,587	0,008
HR6	864	11,294	1,124	24,018	8,211	0,005
HR7	864	11,170	0,931	22,937	7,379	0,009
HR8	864	11,270	1,165	23,872	7,377	0,008

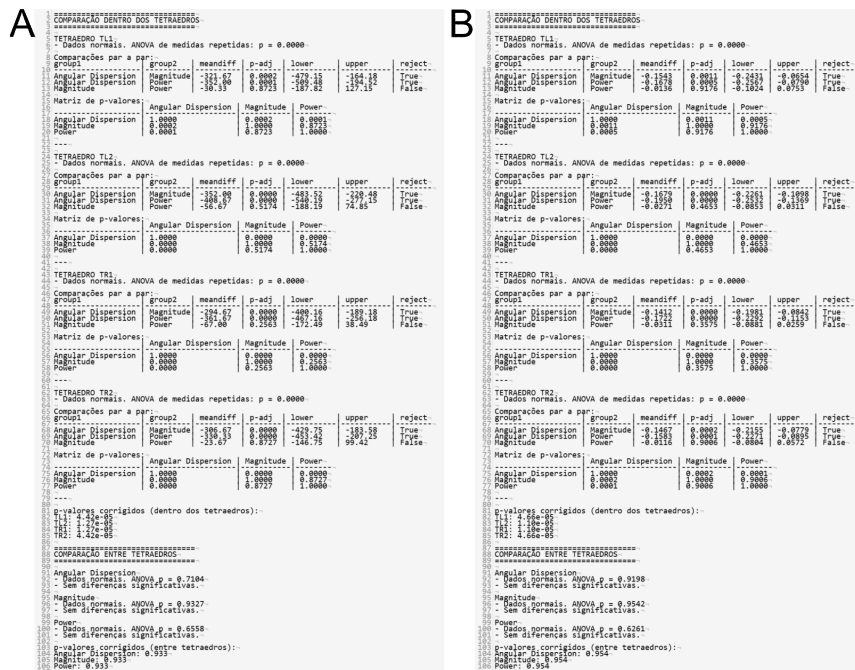


Figura A1 - Análise estatística detalhada da Figura 12. (A) Análise estatística referente à Figura 12B. (B) Análise estatística referente à Figura 12C.

Tabela A2 - Resumo dos valores das Figura 12B (tempo) e Figura 12C (PTZ).

Tetraedro	Parâmetro	N	Tempo (s)			PTZ (g/kg)		
			Q1	Mediana	Q3	Q1	Mediana	Q3
TL1	Dispersão Angular	6	-32,5	3	17,5	0,227	0,244	0,260
	Magnitude	6	-421	-370	-248,5	0,035	0,065	0,099
	Potência	6	-434	-373	-279	0,057	0,061	0,083
TL2	Dispersão Angular	6	-30,5	-6	11	0,228	0,244	0,259
	Magnitude	6	-453,5	-353	-266	0,034	0,071	0,089
	Potência	6	-463	-452	-405	0,038	0,043	0,047
TR1	Dispersão Angular	6	-44	-23	10	0,228	0,244	0,256
	Magnitude	6	-349	-314	-268,5	0,076	0,089	0,097
	Potência	6	-454,5	-413	-316	0,042	0,060	0,091
TR2	Dispersão Angular	6	-50	-22	6	0,228	0,243	0,253
	Magnitude	6	-419,5	-330	-263	0,060	0,073	0,091
	Potência	6	-429,5	-352	-300	0,043	0,060	0,079

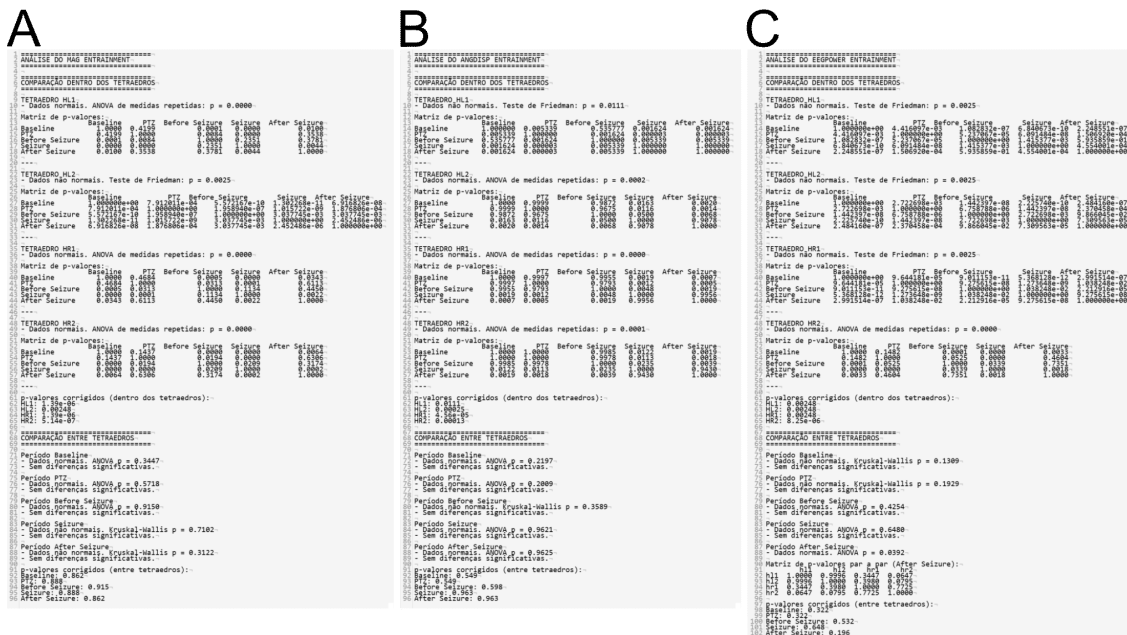


Figura A2 - Análise estatística detalhada da Figura 15B. (A) Referente ao painel de dispersão angular. (B) Referente ao painel de magnitude vetorial. (C) Referente ao painel de potência instantânea do iEEG.

Tabela A3 - Resumo dos valores das Figura 14B.

Tetraedro	Período	N	Dispersão Angular (%)			Magnitude Vetorial (%)			Potência do iEEG (%)		
			Q1	Mediana	Q3	Q1	Mediana	Q3	Q1	Mediana	Q3
TL1	Basal	6	0,104	0,111	0,124	0,010	0,012	0,013	0,009	0,014	0,016

	PTZ	6	0,081	0,086	0,098	0,115	0,169	0,195	0,061	0,073	0,084
	Pré-ictal	6	0,107	0,111	0,160	0,351	0,443	0,481	0,187	0,274	0,349
	Ictal	6	0,227	0,326	0,425	0,500	0,661	0,752	0,456	0,498	0,538
	Pós-ictal	6	0,292	0,359	0,482	0,244	0,283	0,312	0,165	0,200	0,233
	Basal	6	0,089	0,096	0,119	0,013	0,015	0,016	0,004	0,009	0,013
	PTZ	6	0,084	0,088	0,098	0,100	0,129	0,157	0,065	0,071	0,088
TL2	Pré-ictal	6	0,107	0,126	0,155	0,314	0,356	0,401	0,234	0,273	0,341
	Ictal	6	0,207	0,288	0,416	0,689	0,724	0,770	0,515	0,549	0,564
	Pós-ictal	6	0,306	0,363	0,499	0,175	0,203	0,232	0,167	0,197	0,245
	Basal	6	0,070	0,084	0,097	0,008	0,010	0,012	0,019	0,020	0,021
	PTZ	6	0,071	0,078	0,079	0,127	0,166	0,198	0,131	0,215	0,232
TR1	Pré-ictal	6	0,093	0,098	0,139	0,281	0,367	0,567	0,286	0,328	0,438
	Ictal	6	0,274	0,359	0,417	0,576	0,759	0,772	0,510	0,615	0,680
	Pós-ictal	6	0,300	0,397	0,504	0,196	0,263	0,391	0,245	0,270	0,277
	Basal	6	0,076	0,082	0,094	0,011	0,012	0,013	0,014	0,017	0,021
	PTZ	6	0,072	0,078	0,091	0,180	0,193	0,209	0,134	0,178	0,228
TR2	Pré-ictal	6	0,082	0,101	0,130	0,399	0,496	0,519	0,300	0,340	0,380
	Ictal	6	0,224	0,340	0,495	0,627	0,771	0,862	0,558	0,569	0,703
	Pós-ictal	6	0,247	0,449	0,613	0,238	0,291	0,375	0,239	0,282	0,330



Figura A3 - Análise estatística detalhada da Figura 16B, dispersão angular. (A) Referente às comparações intra período (P0), ou entre janelas (P1) de um mesmo período, note que os resultados possuem linhas e colunas correspondem às janelas (0 s; 0,5 s; 1 s; 1.5 s). (B) Referente às comparações entre janelas (P1) dos diferentes períodos (P0), note que cada condição relacionada à janela de determinado tetraedro e os resultados possuem linhas e colunas correspondem aos períodos (em inglês: baseline, PTZ, before, seizure, after). (C) Referente às comparações entre conjuntos de VEEG para todas as janelas (P1) de todos os períodos (P0), note que a condição é dada por P0_X_P1_Y, onde X e Y são as janelas e períodos respectivamente.

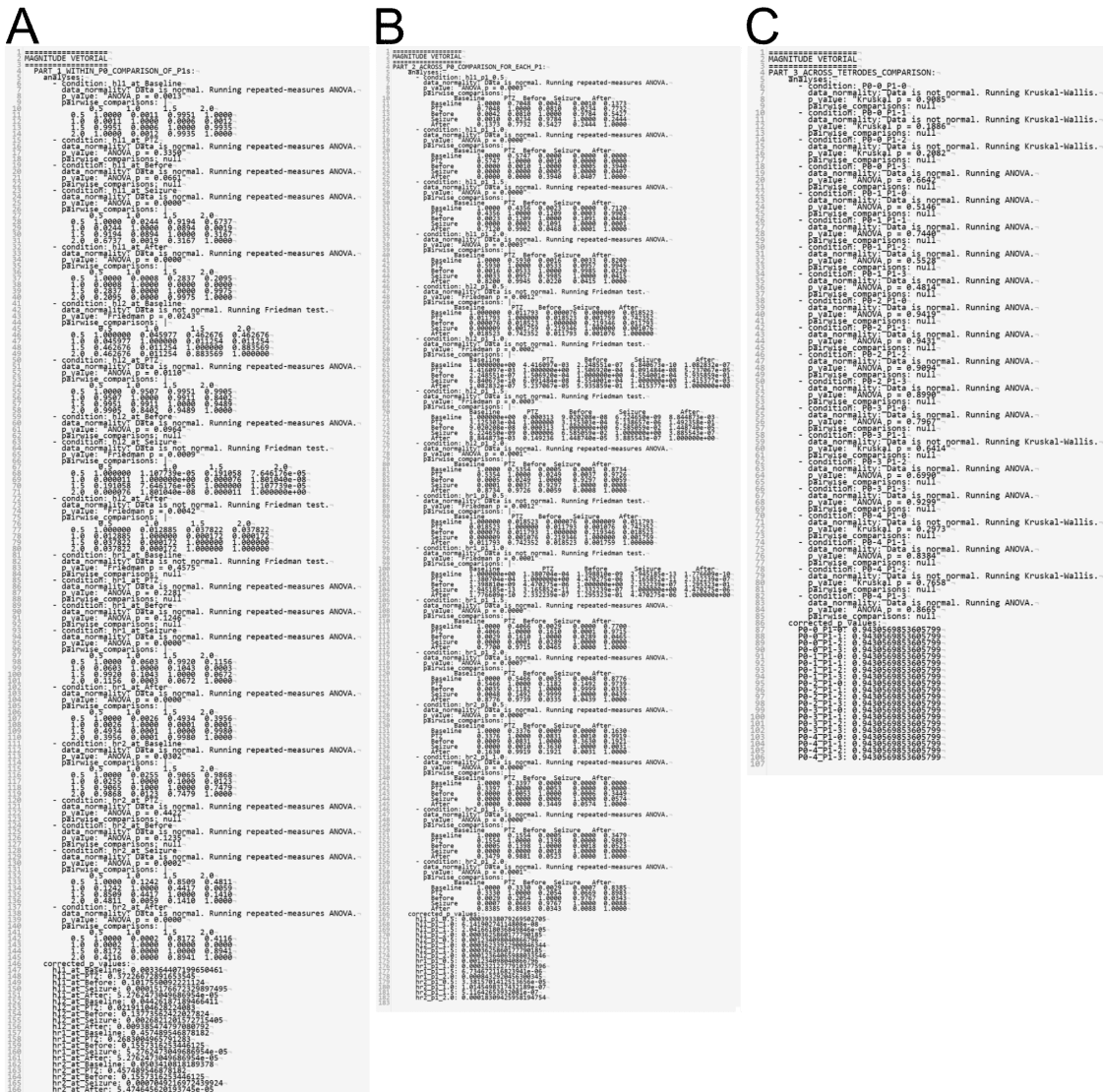


Figura A4 - Análise estatística detalhada da Figura 16B, magnitude vetorial. (A) Referente às comparações intra período (P0), ou entre janelas (P1) de um mesmo período, note que os resultados possuem linhas e colunas correspondem às janelas (0 s; 0,5 s; 1 s; 1.5 s). (B) Referente às comparações entre janelas (P1) dos diferentes períodos (P0), note que cada condição relacionada à janela de determinado tetraedro e os resultados possuem linhas e colunas correspondem aos períodos (em inglês: baseline, PTZ, before, seizure, after). (C) Referente às comparações entre conjuntos de VEEG para todas as janelas (P1) de todos os períodos (P0), note que a condição é dada por P0_X_P1_Y, onde X e Y são as janelas e períodos respectivamente.



Figura A5 - Análise estatística detalhada da Figura 16B, potência instantânea do iEEG. (A) Referente às comparações intra período (P0), ou entre janelas (P1) de um mesmo período, note que os resultados possuem linhas e colunas correspondem às janelas (0 s; 0,5 s; 1 s; 1.5 s). (B) Referente às comparações entre janelas (P1) dos diferentes períodos (P0), note que cada condição relacionada à janela de determinado tetraedro e os resultados possuem linhas e colunas correspondem aos períodos (em inglês: baseline, PTZ, before, seizure, after). (C) Referente às comparações entre conjuntos de VEEG para todas as janelas (P1) de todos os períodos (P0), note que a condição é dada por P0_X_P1_Y, onde X e Y são as janelas e períodos respectivamente.

Tabela A4 - Resumo dos valores das Figura 15B.

Tetraedro	Período	ERP	N	Dispersão Angular (%)			Magnitude Vetorial (%)			Potência do iEEG (%)		
				Q1	Mediana	Q3	Q1	Mediana	Q3	Q1	Mediana	Q3
TL1	Basal	0	6	0,072	0,083	0,125	0,003	0,004	0,007	0,002	0,002	0,003
	PTZ	0	6	0,074	0,086	0,088	0,108	0,148	0,216	0,050	0,074	0,086

	Pré-ictal	0	6	0,085	0,100	0,172	0,325	0,452	0,574	0,154	0,263	0,395
	Ictal	0	6	0,231	0,335	0,443	0,327	0,571	0,686	0,419	0,512	0,604
	Pós-ictal	0	6	0,270	0,354	0,513	0,171	0,246	0,366	0,095	0,121	0,164
	Basal	0,5	6	0,142	0,166	0,213	0,024	0,030	0,035	0,024	0,039	0,056
	PTZ	0,5	6	0,098	0,108	0,124	0,153	0,180	0,193	0,078	0,097	0,113
	Pré-ictal	0,5	6	0,147	0,161	0,253	0,361	0,494	0,664	0,266	0,304	0,527
	Ictal	0,5	6	0,409	0,514	0,652	0,960	0,984	0,991	0,806	0,826	0,865
	Pós-ictal	0,5	6	0,500	0,733	0,823	0,664	0,731	0,790	0,451	0,559	0,652
	Basal	1	6	0,091	0,100	0,103	0,001	0,004	0,006	0,000	0,000	0,008
	PTZ	1	6	0,073	0,078	0,087	0,117	0,184	0,204	0,052	0,072	0,082
	Pré-ictal	1	6	0,089	0,094	0,105	0,228	0,353	0,470	0,145	0,194	0,256
	Ictal	1	6	0,174	0,229	0,366	0,527	0,615	0,805	0,358	0,399	0,437
	Pós-ictal	1	6	0,174	0,254	0,456	0,054	0,110	0,174	0,012	0,018	0,047
	Basal	1,5	6	0,070	0,090	0,124	0,004	0,006	0,009	0,000	0,000	0,000
	PTZ	1,5	6	0,073	0,077	0,083	0,071	0,153	0,188	0,046	0,064	0,078
	Pré-ictal	1,5	6	0,085	0,093	0,097	0,294	0,398	0,503	0,144	0,208	0,300
	Ictal	1,5	6	0,103	0,108	0,140	0,166	0,451	0,516	0,097	0,272	0,370
	Pós-ictal	1,5	6	0,101	0,106	0,115	0,066	0,086	0,121	0,020	0,038	0,049
	Basal	0	6	0,066	0,074	0,089	0,002	0,008	0,010	0,002	0,002	0,002
	PTZ	0	6	0,071	0,077	0,080	0,097	0,117	0,150	0,061	0,070	0,088
	Pré-ictal	0	6	0,086	0,129	0,219	0,293	0,315	0,511	0,205	0,268	0,399
	Ictal	0	6	0,302	0,478	0,666	0,638	0,725	0,739	0,537	0,595	0,603
	Pós-ictal	0	6	0,209	0,347	0,542	0,102	0,128	0,150	0,088	0,151	0,198
	Basal	0,5	6	0,145	0,149	0,182	0,025	0,036	0,054	0,014	0,032	0,051
	PTZ	0,5	6	0,122	0,134	0,141	0,111	0,143	0,171	0,075	0,099	0,118
	Pré-ictal	0,5	6	0,153	0,179	0,224	0,320	0,426	0,573	0,272	0,318	0,569
	Ictal	0,5	6	0,239	0,322	0,415	0,952	0,967	0,984	0,789	0,816	0,879
	Pós-ictal	0,5	6	0,470	0,675	0,770	0,428	0,592	0,822	0,436	0,546	0,630
TL2	Basal	1	6	0,068	0,075	0,094	0,002	0,004	0,007	0,000	0,000	0,000
	PTZ	1	6	0,074	0,079	0,094	0,106	0,130	0,165	0,055	0,074	0,086
	Pré-ictal	1	6	0,086	0,094	0,101	0,273	0,298	0,379	0,178	0,224	0,241
	Ictal	1	6	0,179	0,185	0,350	0,684	0,763	0,855	0,365	0,522	0,624
	Pós-ictal	1	6	0,297	0,364	0,519	0,035	0,071	0,108	0,012	0,029	0,062
	Basal	1,5	6	0,067	0,071	0,074	0,001	0,004	0,008	0,000	0,000	0,000
	PTZ	1,5	6	0,069	0,072	0,084	0,080	0,124	0,154	0,052	0,065	0,075
	Pré-ictal	1,5	6	0,074	0,088	0,105	0,256	0,322	0,399	0,206	0,214	0,302
	Ictal	1,5	6	0,098	0,169	0,237	0,310	0,477	0,535	0,132	0,263	0,362
	Pós-ictal	1,5	6	0,114	0,149	0,205	0,053	0,067	0,077	0,028	0,046	0,055
	Basal	0	6	0,062	0,069	0,077	0,002	0,008	0,010	0,002	0,009	0,019
	PTZ	0	6	0,065	0,073	0,082	0,133	0,152	0,187	0,131	0,190	0,233
TR1	Pré-ictal	0	6	0,069	0,080	0,164	0,253	0,409	0,653	0,258	0,366	0,465
	Ictal	0	6	0,390	0,488	0,623	0,535	0,731	0,812	0,533	0,617	0,744

	Pós-ictal	0	6	0,265	0,401	0,510	0,151	0,203	0,396	0,187	0,219	0,238
	Basal	0,5	6	0,079	0,090	0,132	0,007	0,012	0,014	0,026	0,031	0,041
	PTZ	0,5	6	0,073	0,079	0,085	0,106	0,154	0,207	0,122	0,234	0,244
	Pré-ictal	0,5	6	0,128	0,134	0,192	0,313	0,499	0,633	0,341	0,399	0,562
	Ictal	0,5	6	0,339	0,476	0,530	0,959	0,982	0,991	0,862	0,879	0,911
	Pós-ictal	0,5	6	0,485	0,771	0,826	0,572	0,726	0,878	0,537	0,735	0,755
	Basal	1	6	0,068	0,089	0,106	0,004	0,007	0,015	0,003	0,017	0,026
	PTZ	1	6	0,070	0,075	0,080	0,129	0,179	0,217	0,133	0,226	0,257
	Pré-ictal	1	6	0,077	0,084	0,092	0,189	0,321	0,498	0,225	0,283	0,380
	Ictal	1	6	0,202	0,230	0,331	0,559	0,736	0,832	0,532	0,609	0,618
	Pós-ictal	1	6	0,313	0,346	0,453	0,057	0,139	0,181	0,023	0,030	0,085
	Basal	1,5	6	0,058	0,068	0,070	0,003	0,008	0,009	0,005	0,010	0,014
	PTZ	1,5	6	0,073	0,074	0,076	0,136	0,174	0,189	0,129	0,196	0,208
	Pré-ictal	1,5	6	0,069	0,078	0,094	0,238	0,303	0,566	0,245	0,283	0,464
	Ictal	1,5	6	0,118	0,179	0,230	0,205	0,482	0,552	0,136	0,344	0,473
	Pós-ictal	1,5	6	0,080	0,090	0,144	0,065	0,083	0,151	0,048	0,078	0,089
	Basal	0	6	0,058	0,070	0,081	0,004	0,007	0,011	0,003	0,005	0,008
	PTZ	0	6	0,073	0,076	0,091	0,178	0,198	0,223	0,137	0,175	0,203
	Pré-ictal	0	6	0,068	0,076	0,183	0,341	0,499	0,649	0,266	0,347	0,489
	Ictal	0	6	0,297	0,513	0,605	0,477	0,730	0,882	0,366	0,543	0,759
	Pós-ictal	0	6	0,174	0,375	0,601	0,193	0,250	0,284	0,165	0,216	0,282
	Basal	0,5	6	0,096	0,120	0,141	0,015	0,021	0,036	0,023	0,034	0,043
	PTZ	0,5	6	0,079	0,083	0,099	0,176	0,191	0,203	0,138	0,201	0,238
	Pré-ictal	0,5	6	0,111	0,153	0,192	0,420	0,505	0,696	0,330	0,365	0,550
	Ictal	0,5	6	0,302	0,454	0,502	0,968	0,984	0,991	0,848	0,870	0,924
	Pós-ictal	0,5	6	0,477	0,772	0,816	0,508	0,757	0,930	0,528	0,687	0,764
TR2	Basal	1	6	0,071	0,081	0,092	0,008	0,010	0,011	0,005	0,016	0,021
	PTZ	1	6	0,070	0,076	0,088	0,180	0,207	0,226	0,131	0,186	0,252
	Pré-ictal	1	6	0,067	0,085	0,099	0,311	0,416	0,498	0,204	0,285	0,334
	Ictal	1	6	0,168	0,215	0,454	0,735	0,825	0,902	0,562	0,658	0,720
	Pós-ictal	1	6	0,242	0,490	0,694	0,057	0,180	0,248	0,088	0,169	0,221
	Basal	1,5	6	0,060	0,064	0,067	0,002	0,004	0,008	0,001	0,005	0,006
	PTZ	1,5	6	0,072	0,082	0,085	0,158	0,184	0,206	0,126	0,148	0,213
	Pré-ictal	1,5	6	0,071	0,080	0,081	0,349	0,437	0,535	0,254	0,314	0,345
	Ictal	1,5	6	0,120	0,168	0,298	0,277	0,558	0,675	0,237	0,337	0,493
	Pós-ictal	1,5	6	0,092	0,156	0,223	0,061	0,079	0,101	0,034	0,071	0,105

ANEXO II - Artigos Publicados

Journal of Neuroscience Methods 411 (2024) 110245



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneumeth

CircadiPy: An open-source toolkit for analyzing chronobiology time series

João Pedro Carvalho-Moreira^{a,b}, Leonardo de Oliveira Guarnieri^{a,b}, Matheus Costa Passos^a, Felipe Emrich^a, Paula Bargi-Souza^a, Rodrigo Antonio Peliciari-Garcia^c, Márcio Flávio Dutra Moraes^{a,b,*}

^a Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

^b Centro de Tecnologia e Pesquisa em Magneto Ressonância, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

^c Departamento de Ciências Biológicas, Setor de Morfofisiologia e Patologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Diadema, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Chronobiology
Python
Cosinor
Acrophase
Rhythm parameters

ABSTRACT

Background: Chronobiology is the scientific field focused on studying periodicity in biological processes. In mammals, most physiological variables exhibit circadian rhythmicity, such as metabolism, body temperature, locomotor activity, and sleep. The biological rhythmicity can be statistically evaluated by examining the time series and extracting parameters that correlate to the period of oscillation, its amplitude, phase displacement, and overall variability.

New method: We have developed a library called CircadiPy, which encapsulates methods for chronobiological analysis and data inspection, serving as an open-access toolkit for the analysis and interpretation of chronobiological data. The package was designed to be flexible, comprehensive and scalable in order to assist research dealing with processes affected or influenced by rhythmicity.

Results: The results demonstrate the toolkit's capability to guide users in analyzing chronobiological data collected from various recording sources, while also providing precise parameters related to the circadian rhythmicity.

Comparison with existing methods: The analysis methodology from this proposed library offers an opportunity to inspect and obtain chronobiological parameters in a straightforward and cost-free manner, in contrast to commercial tools.

Conclusions: Moreover, being an open-source tool, it empowers the community with the opportunity to contribute with new functions, analysis methods, and graphical visualizations given the simplified computational method of time series data analysis using an easy and comprehensive pipeline within a single Python object.

1. Introduction

Chronobiology is the scientific field dedicated to investigating periodicity in various biological and behavioral processes, particularly focusing on the circadian cycle. This cycle, an internal rhythm that repeats roughly every 24 hours, plays a crucial role in synchronizing the organisms, allowing its daily anticipation imposed by the environmental demands (Duffy and Dijk, 2002; Edgar et al., 1993; Moore-Ede et al., 1982). The suprachiasmatic nucleus (SCN) in the hypothalamus is regarded as the master circadian pacemaker in mammals (Colwell and Foster, 1992; Meijer and Rietveld, 1989). SCN neurons exhibit an intrinsic activity cycle of approximately 24 hours, coordinating and

synchronizing various physiological rhythms within the body. These oscillations, or circadian clocks, are generated by autoregulatory transcriptional-translational feedback loops of the so-called clock genes. Significantly, the rhythmic expression of clock genes has been described virtually in all cell types including those outside of the SCN, characterized as peripheral clocks (Dardente et al., 2007).

The circadian clock regulates a variety of crucial processes, including metabolism, body temperature regulation, locomotor activity, and the sleep-wake cycle (Borbély et al., 1980; Huang et al., 2011). Disruption of this delicate balance can lead to severe health consequences. Research has shown that disturbances in the circadian clock are strongly linked to an increased risk of cardiovascular diseases (Bray et al., 2008; Chellappa

* Correspondence to: Núcleo de Neurociências, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG CEP 31270-901, Brazil.

E-mail address: mfdm@icb.ufmg.br (M.F.D. Moraes).

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2024.110245>

Received 7 May 2024; Received in revised form 9 July 2024; Accepted 5 August 2024

Available online 6 August 2024

0165-0270/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Hypothyroidism alters the rhythmicity of the central clock, body temperature and metabolism: evidence of *Bmal1* transcriptional regulation by T3

Felipe Emrich¹, Bruno Henrique Gomes¹, Leticia Selvatici-Tolentino¹, Roberta Araújo Lopes¹, Ayla Secio-Silva¹, João Pedro Carvalho-Moreira¹, Paloma Grazielle Bittencourt-Silva¹, Leonardo de Oliveira Guarnieri^{1,2}, Ana Bárbara de Paula Silva¹, Lucas Rios Drummond³, Glauber Santos Ferreira da Silva¹, Raphael Escorsim Szawka¹, Márcio Flávio Dutra Moraes¹, Cândido Celso Coimbra¹, Rodrigo Antonio Peliciari-Garcia⁴ and Paula Bargi-Souza¹

¹Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

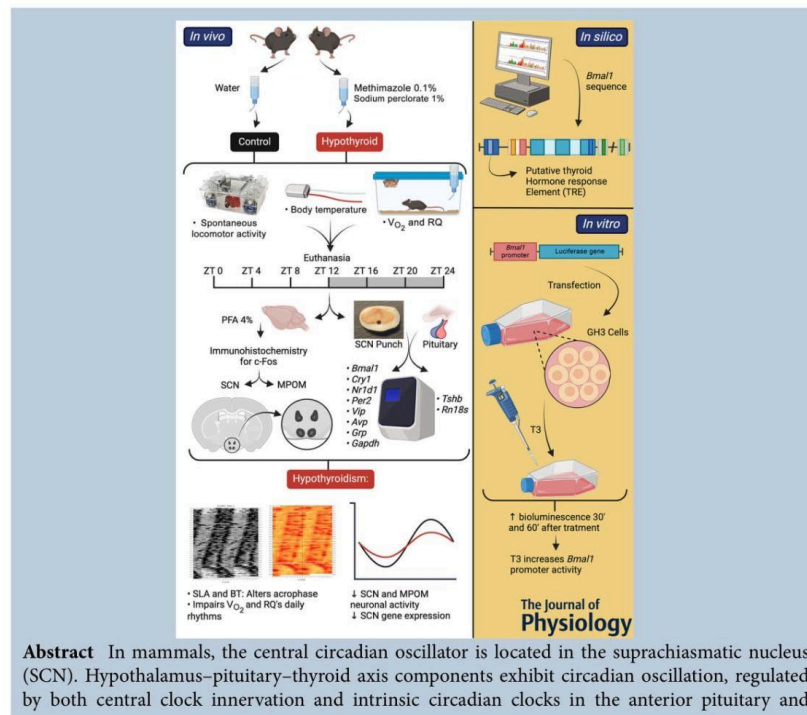
²Department of Electrical Engineering, Engineering School, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

³Department of Sciences and Motion, State University of Minas Gerais (UEMG), Divinópolis, MG, Brazil

⁴Department of Biological Sciences, Morphophysiology and Pathology Sector, Federal University of São Paulo (UNIFESP), Diadema, SP, Brazil

Handling Editors: Paul Greenhaff & Max Petersen

The peer review history is available in the Supporting Information section of this article (<https://doi.org/10.1113/JP286449#support-information-section>).



ANEXO III - Aprovação dos protocolos experimentais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "MICROMAP: Sistema De Aquisição Digital De Sinais", protocolo do CEUA: 57/2025 sob a responsabilidade de Marcio Flavio Dutra Moraes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/04/2025.

Vigência da Autorização	07/04/2025 a 06/04/2030
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	8
Peso/Idade	250g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	8
Peso/Idade	250g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	16
Idade	8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central UFMG

Considerações posteriores:

08/04/2025	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 07/04/2025. Validade: 07/04/2025 à 06/04/2030.
------------	---

Belo Horizonte, 13/07/2025.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da Dinâmica Espaço-Temporal da Propagação de uma Crise Epiléptica Focal por Meio de Amostras Vetoriais de Campo Elétrico", protocolo do CEUA: 266/2023 sob a responsabilidade de Marcio Flavio Dutra Moraes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 04/12/2023.

Vigência da Autorização	04/12/2023 a 03/12/2028
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	18
Peso/Idade	250g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	18
Peso/Idade	250g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	36
Idade	8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central

Considerações posteriores:

04/12/2023	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 04/12/2023. Validade: 04/12/2023 à 03/12/2028.
------------	---

Belo Horizonte, 13/07/2025.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "A Estimulação Optogenética De Padrões Temporais Na Formação De Uma Memória Aversiva", protocolo do CEUA: 41/2025 sob a responsabilidade de Marcio Flavio Dutra Moraes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/04/2025.

Vigência da Autorização	03/04/2025 a 02/04/2030
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	12
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	12
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	12
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	36
Idade	8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

03/04/2025	Aprovado no dia 03/04/2025. Validade: 03/04/2025 à 02/04/2030. Aprovação será homologada na reunião de 07/04/2025.
------------	--

Belo Horizonte, 13/07/2025.