

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

Matheus Victor Ramos dos Anjos

**Análise da Dinâmica Neural na Via Acústico-Límbica Frente à Tarefa de
Aprendizagem Associativa em Modelo Experimental de Laboratório**

Belo Horizonte

2023

Matheus Victor Ramos dos Anjos

**Análise da Dinâmica Neural na Via Acústico-Límbica Frente à Tarefa de
Aprendizagem Associativa em Modelo Experimental de Laboratório**

Dissertação de Mestrado 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 Título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Orientador: Prof. Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes

Co-orientador: Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão

Belo Horizonte

2023

A599a Anjos, Matheus Victor Ramos dos.
Análise da dinâmica neural na via acústico-límbica de um robô frente à tarefa de aprendizagem associativa em modelo experimental de laboratório [recurso eletrônico] / Matheus Victor Ramos dos Anjos. - 2023. 1 recurso online (107 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes.
Coorientador: Flávio Afonso Gonçalves Mourão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 102-106.
Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia elétrica - Teses. 2. Análise espectral - Teses. 3. Colículo inferior - Teses. 4. Aprendizagem - Teses. 5. Tempo - Estudo - Teses. 6. Robôs - Teses. 7. Redes neurais (Computação) - Teses. I. Mendes, Eduardo Mazoni Andrade Marçal. II. Mourão, Flávio Afonso Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 621.3(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"ANÁLISE DA DINÂMICA NEURAL NA VIA ACÚSTICO-LÍMBICA FRENTE À TAREFA DE APRENDIZAGEM ASSOCIATIVA EM MODELO EXPERIMENTAL DE LABORATÓRIO"

MATHEUS VICTOR RAMOS DOS ANJOS

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Engenharia Elétrica. Aprovada em 17 de novembro de 2023. Por:

Prof. Ph.D. Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes
DELT (UFMG) - Orientador

Prof. Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão
(UFMG) - Coorientador

Prof. Dr. Danilo Barbosa Melges
DEE (UFMG)

Dr. Vinicius Rezende Carvalho
RITMO Centre for Interdisciplinary Studies in Rhythm, Time and Motion (University of Oslo)



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes, Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2023, às 11:04, 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 Rezende Carvalho, Usuário Externo**, em 30/11/2023, às 11:21, 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 **Flávio Afonso Gonçalves Mourão, Usuário Externo**, em 30/11/2023, às 13:24, 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 **Danilo Barbosa Melges, Professor do Magistério Superior**, em 30/11/2023, às 16:46, 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 **2856458** e o código CRC **19089849**.

A Deus, pelo dom da vida e da salvação através de seu Filho Jesus Cristo. À minha família, por seu amor incondicional, apoio constante e compreensão. Por sempre terem acreditado em mim. Aos meus amigos, pelo apoio, por acreditarem em mim e por tornarem os dias mais leves.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus. Agradeço à minha família pelo amor e apoio incondicionais. Agradeço aos meus amigos, em especial ao Johnny, que me acompanhou nessa jornada acadêmica desde o ensino médio e me ouviu falar tanto sobre os trabalhos e estudos.

Expresso minha gratidão ao Eduardo Mazoni pela orientação e por toda a ajuda prestada durante este trabalho realizado em um momento tão incerto. Agradeço ao Flávio Mourão pela coorientação de alto nível, pela paciência em explicar neurobiologia a um engenheiro sem qualquer experiência na área, além da amizade e companheirismo.

Também quero agradecer à Enacom por proporcionar a oportunidade de trabalhar em uma empresa séria que valoriza o aperfeiçoamento pessoal, tornando possível conciliar o trabalho e o mestrado sem sacrificar a qualidade de nenhum deles.

Agradeço ao PPGEE, à Capes, ao CNPQ, à Fapemig e demais órgãos de fomento, que tornaram possível a realização deste trabalho de mestrado, além de apoiar a publicação dos resultados.

Por fim, agradeço a todos que fizeram parte da minha vida nessa etapa tão desafiadora, mas de grande crescimento e desenvolvimento pessoal. Suas contribuições e apoio foram fundamentais para alcançar este marco.

“E da parte de Jesus Cristo, que é a fiel testemunha, o primogênito dentre os mortos e o príncipe dos reis da terra. Àquele que nos amou, e em seu sangue nos lavou dos nossos pecados, e nos fez reis e sacerdotes para Deus e seu Pai; a ele glória e poder para todo o sempre. Amém.”

Apocalipse 1:5,6

RESUMO

Resumo Este trabalho apresenta o uso da análise espectral de alta ordem no domínio do tempo para identificar alterações na rede neural acústico límbica após uma tarefa de aprendizagem associativa em roedores. Tem sido demonstrado que durante tarefas de condicionamento de medo auditivo, os potenciais evocados no colículo inferior exibem oscilações na mesma frequência que a frequência moduladora do estímulo sonoro utilizado como estímulo condicionado, apresentando aumento da potência e sincronismo para tal frequência. Em outros substratos cerebrais, são observados aumentos predominantes na banda de frequência θ , entre 4 a 8 Hz, além de aumentos significativos na banda γ . O presente trabalho discute as vantagens e desvantagens do uso da análise espectral de alta ordem no domínio do tempo em comparação com as técnicas tradicionais de identificação de atributos relacionados à plasticidade neural, como aumentos na sincronia de fase e potência. Ressalta-se que a análise espectral de alta ordem no domínio do tempo pode fornecer informações úteis sobre possíveis não linearidades e acoplamento de frequência durante a análise. O trabalho fornece uma visão geral dos fundamentos matemáticos de cada técnica e enfatiza o potencial da análise espectral de alta ordem no domínio do tempo como uma ferramenta valiosa para a análise de registros eletrofisiológicos. Foram analisados duas diferentes bases de dados, uma publicada, cujos registros foram realizados apenas no mesencéfalo de ratos, no caso o colículo inferior (IC), [Simões et al., 2020] e outra, não publicada, cujos registros foram realizados ao longo de todo via acústico límbica de camundongos, como colículo inferior, complexo amigdalóide e córtex pré-frontal medial. Os resultados obtidos possuem valiosas informações para a compreensão da dinâmica complexa de redes neurais, que permite identificar os mecanismos subjacentes da plasticidade neural.

Palavras-chave: tarefa de aprendizagem associativa; colículo inferior; análise espectral de alta ordem no domínio do tempo; agrupamento de fase médio; bispectro; trispectro; quadrispectro.

ABSTRACT

This work presents the use of time-domain high-order spectral analysis to identify changes in the limbic acoustic neural network following an associative learning task in rodents. It has been demonstrated that during auditory fear conditioning tasks, potentials evoked in the inferior colliculus exhibit oscillations at the same frequency as the modulating frequency of the sound stimulus used as conditioned stimulus, presenting increased power and synchronism for that frequency. In other brain substrates, predominant increases are observed in the θ frequency band, between 4 to 8 Hz, in addition to significant increases in the γ band. The present work discusses the advantages and disadvantages of using time-domain high-order spectral analysis compared to traditional techniques for identifying attributes related to neural plasticity, such as increases in phase synchrony and power. It is noteworthy that time-domain high-order spectral analysis can provide valuable information about possible nonlinearities and frequency coupling. The work provides an overview of the mathematical foundations of each technique, emphasizing the potential of time-domain high-order spectral analysis as a valuable tool for analyzing electrophysiological recordings. Two different databases were studied, one published, whose records were made only in the midbrain of rats, in this case, the inferior colliculus (IC), [Simões et al., 2020] and another, unpublished, whose records were made throughout the entire route limbic acoustic system of mice, such as inferior colliculus, amygdaloid complex, and medial prefrontal cortex. The results obtained contain valuable information for understanding the complex dynamics of neural networks, which enables the identification of the underlying mechanisms of neural plasticity.

Keywords: associative learning task; inferior colliculus; time domain high order spectra analysis; mean phase clustering; bispectrum; trispectrum; quadrispectrum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do sinal teórico sem ruído.	30
Figura 2 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do sinal teórico com ruído gaussiano de média nula e com mesmo desvio padrão do sinal puro.	31
Figura 3 – Diagrama do experimento de biológico.	37
Figura 4 – Filtro passa faixas para análise de sincronismo de fase. As linhas verticais tracejadas indicam a banda de corte do filtro.	38
Figura 5 – Etapas para a identificação automática dos eventos sonoros a partir do sinal do estímulo sonoro utilizado. Em ordem, o sinal é subtraído de sua média, elevado ao quadrado para se tornar positivo. Um filtro média deslizante de 100 amostras é aplicado, e após isso, é feita a operação de limiar (<i>threshold</i>), resultando nos eventos sonoros.	40
Figura 6 – O primeiro painel mostra o sinal coletado no IC durante a etapa de habituação, e o segundo painel mostra o sinal coletado no IC durante a etapa de teste. Os trechos em colorido indicam a ocorrência de um estímulo auditivo condicionado.	47
Figura 7 – FFT do IC durante os eventos sonoros dos experimentos de habituação e teste.	48
Figura 8 – Espectrograma para o experimento completo de habituação.	48
Figura 9 – Espectrograma para o experimento completo de teste.	49
Figura 10 – MPCs de dois experimentos. A primeira linha, de (a) a (e), consiste nos 5 eventos sonoros de ambientação. A segunda linha, de (f) a (j), são os MPCs dos 5 eventos de teste, respectivamente.	50
Figura 11 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro no domínio do tempo para os 5 eventos de habituação.	51
Figura 12 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro no domínio do tempo para os 5 eventos de teste.	51
Figura 13 – Sinais nos substratos cerebrais durante a fase de habituação. O primeiro sinal se trata do estímulo condicionado, aplicado durante o AFC. Os demais sinais são os sinais registrados nos seguintes substratos: substratos infra-límbico e pré-límbico do córtex pré-frontal medial, amígdala lateral e basolateral e o colículo inferior, respectivamente. Apenas o canal com maior resposta evocada em cada substrato foi usado.	53

Figura 14 – Sinais nos substratos cerebrais durante a fase de teste. O primeiro sinal se trata do estímulo condicionado, aplicado durante o AFC. Os demais sinais são os sinais registrados nos seguintes substratos: substratos infra-límbico e pré-límbico do córtex pré-frontal medial, amígdala lateral e basolateral e o colículo inferior, respectivamente. Apenas o canal com maior resposta evocada em cada substrato foi usado.	54
Figura 15 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para o evento 1, durante a habituação e o teste, respectivamente.	56
Figura 16 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para o evento 2, durante a habituação e o teste, respectivamente.	57
Figura 17 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para o evento 3, durante a habituação e o teste, respectivamente.	57
Figura 18 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para o evento 4, durante a habituação e o teste, respectivamente.	58
Figura 19 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para o evento 5, durante a habituação e o teste, respectivamente.	58
Figura 20 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 2, durante a habituação e o teste, respectivamente.	60
Figura 21 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 2, ampliados na faixa de frequências entre 4 a 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.	61
Figura 22 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 2, ampliados na faixa de frequências entre 50 a 60 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.	61
Figura 23 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 3, durante a habituação e o teste, respectivamente.	62
Figura 24 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 3, ampliados na faixa de frequências entre 4 a 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.	62
Figura 25 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 3, ampliados na faixa de frequências entre 50 a 60 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.	63
Figura 26 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 2, durante a habituação e o teste, respectivamente.	64
Figura 27 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 2, ampliados na faixa de frequências entre 4 a 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.	65

Figura 28 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 2, ampliados na faixa de frequências entre 50 a 60 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.	65
Figura 29 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 3, durante a habituação e o teste, respectivamente.	66
Figura 30 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 3, ampliados na faixa de frequências entre 4 a 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.	66
Figura 31 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 3, ampliados na faixa de frequências entre 50 a 60 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.	67
Figura 32 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 2, durante a habituação e o teste, respectivamente.	68
Figura 33 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 2, ampliados na banda de frequência entre 4 e 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.	69
Figura 34 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 2, ampliados entre 50 e 60 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.	69
Figura 35 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 3, durante a habituação e o teste, respectivamente.	70
Figura 36 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 3, ampliados na banda de frequência entre 4 e 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.	70
Figura 37 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 3, ampliados entre 50 e 60 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.	71
Figura 38 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 2, durante a habituação e o teste, respectivamente.	72
Figura 39 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 2, ampliados entre 4 e 15 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.	73
Figura 40 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 2, ampliados entre 50 e 60 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.	73

Figura 41 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 3, durante a habituação e o teste, respectivamente.	74
Figura 42 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 3, ampliados entre 4 e 15 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.	74
Figura 43 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 3, ampliados entre 50 e 60 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.	75
Figura 44 – Comportamento de congelamento do sujeito experimental durante a etapa de teste do AFC. O primeiro painel corresponde aos eventos de estímulo sonoro, seguido pelo segundo painel, que apresenta a presença de comportamento de congelamento do animal durante o AFC.	76
Figura 45 – Diagrama comportamental durante as etapas de habituação (esquerda) e teste (direita) durante um AFC. Painel superior: trajetória de exploração espacial do animal durante o AFC. Painel inferior: gráficos contendo histograma de deslocamento espacial em centímetros, bem como a forma de onda do estímulo sonoro em azul, e abaixo, o início dos comportamentos de congelamento em vermelho.	77
Figura 46 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do primeiro comportamento de congelamento.	79
Figura 47 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo lateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do primeiro comportamento de congelamento.	79
Figura 48 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo basolateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do primeiro comportamento de congelamento.	80
Figura 49 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do primeiro comportamento de congelamento.	80
Figura 50 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do primeiro comportamento de congelamento.	81
Figura 51 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do segundo comportamento de congelamento.	82

Figura 52 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo lateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do segundo comportamento de congelamento.	82
Figura 53 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo basolateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do segundo comportamento de congelamento.	83
Figura 54 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do segundo comportamento de congelamento.	83
Figura 55 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do segundo comportamento de congelamento.	84
Figura 56 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do terceiro comportamento de congelamento.	85
Figura 57 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo lateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do terceiro comportamento de congelamento.	86
Figura 58 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo basolateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do terceiro comportamento de congelamento.	86
Figura 59 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do terceiro comportamento de congelamento.	87
Figura 60 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do terceiro comportamento de congelamento.	87
Figura 61 – Termos ordenados (e já truncados) gerados pelo Critério de Taxa de Redução de Erro.	89
Figura 62 – Critério de Informação de Akaike para os termos inseridos no modelo NARX na ordem determinada pelo ERR. 17 termos foram escolhidos.	90
Figura 63 – Regressores do modelo NARX escolhidos com o auxílio do ERR e do Critério de Informação de Akaike.	91
Figura 64 – Parâmetros para o modelo NARX obtidos através do estimador de Mínimos Quadrados.	91
Figura 65 – Simulação Livre do Modelo NARX obtido.	92
Figura 66 – Espectro, Bispectro, Trispectro e Quadrispectro para o evento sonoro 1 do sinal medido no colículo inferior.	93

Figura 67 – Espectro, Bispectro, Trispectro e Quadrispectro para a simulação livre do modelo NARX.	94
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Frequência e amplitudes principais do sinal teórico da Equação 2.5. . . . 29
- Tabela 2 – Amplitudes dos 5 eventos sonoros durante a fase de teste para os 4 canais do IC e valor médio entre eventos sonoros. As linhas relativas ao *Número do Evento* possuem uma escala de cores branco-vermelho onde quanto mais vermelho, maior a amplitude. A linha *Amplitude Média em 53,71 Hz* possui uma escala de cores vermelho-branco-verde, onde a temperatura da cor está relacionada ao valor médio da amplitude da frequência moduladora dos 5 eventos sonoros, sendo vermelho o máximo, branco um valor intermediário e verde o mínimo. 55

LISTA DE ALGORITMOS

1	TDQS - <i>Time Domain Quadrispectrum</i>	44
---	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	<i>Amígdala Basolateral</i>
AFC	<i>Auditory Fear Conditioning</i>
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i>
AL	<i>Amígdala Lateral</i>
BIC	<i>Bayes Information Criterion</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CS	<i>Conditioning Stimulus</i>
ERR	<i>Error Reduction Rate</i>
FFT	Fast Fourier Transform
FPE	<i>Final Prediction Error</i>
HOSA	<i>High Order Spectral Analysis</i>
IC	<i>Inferior Colliculus</i>
MACSIN	Laboratório de Modelagem, Análise e Controle de Sistemas Não-Lineares
MPC	<i>Mean Phase Clustering</i>
NARX	<i>Non-linear Auto-Regressive With Exogenous Input Model</i>
NNC	Núcleo de Neurociência
STFT	<i>Short Time Fourier Transform</i>
TDBS	<i>Time Domain Bispectrum</i>
TDHOSA	<i>Time Domain High Order Spectral Analysis</i>
TDQS	<i>Time Domain Quadrispectrum</i>
TDS	<i>Time Domain Spectrum</i>
TDTS	<i>Time Domain Trispectrum</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE SÍMBOLOS

γ gama

θ teta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	Condicionamento ao medo	23
2.2	Processamento sensorial na via acústico-límbica	24
2.3	Técnicas de análise	25
2.3.1	Transformada de Fourier rápida	25
2.3.2	Espectrograma	26
2.3.3	Agrupamento Médio de Fase	26
2.3.4	Análise Espectral De Alta Ordem No Domínio Do Tempo	27
2.4	Técnicas de Modelagem	30
2.4.1	Modelagem - Modelos Paramétricos Polinomiais	30
2.4.2	Modelo Não-Linear Auto Regressivo com Estímulo Exógeno (NARX)	32
2.4.3	Taxa de Redução de Erro	32
2.4.4	Critério de Informação de Akaike	33
3	METODOLOGIA	34
3.1	Contextos experimentais	34
3.2	Sujeito experimental	34
3.3	Protocolo Cirúrgico	35
3.4	Estímulo auditivo	36
3.5	Protocolo de condicionamento ao medo auditivo	36
3.6	Registro eletrofisiológico	36
3.7	Pós-Processamento e análise dos registros eletrofisiológicos	37
3.7.1	Filtragem	37
3.7.2	Decimação	38
3.7.3	Seleção de eventos	39
3.8	Algoritmos para análise dos dados coletados	41
3.8.1	Transformada de Fourier Rápida (FFT)	41
3.8.2	Agrupamento Médio de Fase - MPC	41
3.8.3	Espectrograma	42
3.8.4	Análise Espectral de Alta Ordem no Domínio do Tempo	42
3.9	Modelagem Polinomial Não-Linear	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Base de dados número 1 - Alterações plásticas no Colículo Inferior após condicionamento clássico ao medo	46
4.1.1	Introdução	46

4.1.2	Transformada de Fourier rápida - FFT	47
4.1.3	Espectrograma	48
4.1.4	Agrupamento Médio de Fase - MPC	49
4.1.5	Análise Espectral de Alta Ordem no Domínio do Tempo - TDHOSA	50
4.1.6	Considerações	52
4.2	Base de dados número 2 - Análise via TDHOSA em vários substratos cerebrais	52
4.2.1	Introdução	52
4.2.2	Colículo Inferior	55
4.2.3	Amígdala Lateral	59
4.2.4	Amígdala Basolateral	63
4.2.5	Córtex Pré-Frontal Pré-Límbico	67
4.2.6	Córtex Pré-Frontal Infra-Límbico	71
4.2.7	Análise de comportamento de congelamento	75
4.2.8	Análise Espectral de Alta Ordem no Domínio do Tempo do Conge- lamento	78
4.2.8.1	Primeiro Evento de Congelamento	78
4.2.8.2	Segundo Evento de Congelamento	81
4.2.8.3	Terceiro Evento de Congelamento	84
4.2.9	Considerações	88
4.3	Modelagem Polinomial Não-Linear	88
4.3.1	Introdução	88
4.3.2	Critério de Taxa de Redução de Erro (ERR)	89
4.3.3	Critério de Informação de Akaike	89
4.3.4	Estimação dos Parâmetros do Modelo	90
4.3.5	Simulação Livre	91
4.3.6	Análise Espectral de Alta Ordem no Domínio do Tempo da Simulação Livre	92
4.3.7	Considerações	95
4.4	Considerações Finais	95
5	CONCLUSÃO	100
	Referências	102

1 INTRODUÇÃO

Em neurociências, inúmeros esforços tem sido realizados para a interpretação da atividade neural oscilatória, registrada através de técnicas eletrofisiológicas [Herreras, 2016]. Dentre as inúmeras aplicações diagnósticas, análises tempo-frequência têm contribuído para o entendimento da dinâmica da atividade neural relativa aos processos cognitivos [Fell and Axmacher, 2011]. Nesse sentido, a importância de se quantificar o processamento da atividade oscilatória associada à sua função biológica, tem estimulado o desenvolvimento de ferramentas matemáticas que permitem a detecção de padrões espaço-temporais de ativação da rede. Padrões que, em parte, emergem a partir dos estímulos sensoriais ambientais [Laurent et al., 1996].

Embora as técnicas tradicionais de análise de registros eletrofisiológicas tenham tido sucesso em aplicações específicas (p.ex estudo do recrutamento e da ativação da rede neural), algumas limitações importantes não são comumente levadas em conta, subestimando as informações disponíveis no registro. Por exemplo, a análise espectral de potência quantifica apenas a distribuição de potência em função da frequência, ignorando as informações de fase, assumindo uma distribuição linear e ignorando a interação da potência com os componentes do sinal que se manifestam com a fase, um fenômeno não linear, natural no sistema nervoso central [Sigl and Chamoun, 1994].

As técnicas de análise espectral de alta ordem (*High Order Spectral Analysis - HOSA*), como o bispectro (3^a ordem), trispectro (4^a ordem), quadrispectro (5^a ordem) e assim por diante, são definidas como a transformada de Fourier do cumulante de ordem $n+1$ do sinal [Nikias and Raghuvver, 1987]. A técnica é utilizada no processamento de sinais geofísicos e astrofísicos, na detecção de acoplamentos de fase e não-linearidade em sistemas e séries temporais, na estimação de atraso de tempo, na supressão de ruído gaussiano de características espectrais desconhecidas, detecção de acoplamento entre substratos cerebrais [Sherman et al., 2004], na extração de características em sinais eletrofisiológicos de roedores [Furtado Boreli, 2018] e muitos outros. Porém, os espectros de alta ordem clássicos são de difícil interpretação, por se tratarem de gráficos multidimensionais com muitas simetrias, o que motivou o uso de um método alternativo de fácil interpretação, para a sua estimação. Sendo assim, com base em equações diferenciais de atraso, Lainscsek and Sejnowski [2015] apresentaram uma alternativa baseada na estimação dos espectros no domínio do tempo, que foi analisada e expandida em [Furtado Boreli, 2018]. Tal técnica é denominada Análise Espectral de Alta Ordem no Domínio do Tempo (*Time Domain High Order Spectra Analysis - TDHOSA*) e gera um gráfico bidimensional e assimétrico, tal qual uma transformada de Fourier unilateral.

Nesse contexto, o presente trabalho objetiva implementar a TDHOSA, por meio

de uma análise exploratória, em duas bases de dados neurofisiológicos, uma já publicada [Simões et al., 2020] e outra que ainda está em processo de coleta, visando analisar características não-lineares presente nas mesmas.

Na base de dados já publicada [Simões et al., 2020], averiguou-se as alterações plásticas em um circuito mesencefálico, no caso o colículo inferior (IC) de ratos, adultos, machos, da linhagem Wistar, após uma tarefa de aprendizado associativo, denominada condicionamento clássico ao medo [Simões et al., 2020]. Foram utilizadas as mesmas técnicas, como a transformada rápida de Fourier (*fast Fourier transform* - FFT), espectrograma e agrupamento médio de fase (*mean phase clustering* - MPC), comparando com o TDHOSA, buscando ressaltar as vantagens e desvantagens de cada técnica, introduzindo os benefícios desta última, além de apresentar o fundamento matemático de cada uma.

A segunda base de dados segue o mesmo protocolo experimental da primeira, contudo, com registros realizados em 3 diferentes substratos cerebrais que compõe a via acústico límbica, como o colículo inferior, o complexo amigdalóide e o córtex pré-frontal medial. Nesse caso, os registros foram realizados em camundongos, adultos, machos, da linhagem C57/BL6J. Para esses dados foi realizado apenas a TDHOSA.

Por fim, além da análise dos dados eletrofisiológicos utilizando as técnicas citadas, também foram feitas tentativas de modelagem utilizando modelos auto-regressivos não lineares com sinal exógeno, na segunda base de dados, uma vez que a mesma apresenta sinais registrados em diferentes substratos cerebrais. Para isso, foram utilizadas técnicas de modelagem para a seleção de regressores para o modelo, estimação de parâmetros e simulação-livre, além da FFT e da TDHOSA para cada sinal obtido via simulação-livre, com o objetivo de validar o quão bem tais modelos representam o sinal no domínio da frequência.

A presente dissertação é organizada da seguinte maneira: o Capítulo 2 apresenta a revisão bibliográfica, contextualizando o problema e apresentando abordagens adotadas, fundamentos teóricos e embasamentos para os experimentos. O Capítulo 3 apresenta a metodologia aplicada para a coleta, processamento e análise dos dados. O Capítulo 4 é dividido nas seguintes seções: Seção 1, resultados obtidos com a análise da base de dados número 1. Seção 2, resultados obtidos com a análise da base de dados número 2 usando a TDHOSA. Seção 3, modelagem polinomial não-linear da base de dados de número 2, em forma de documentação da técnica utilizada. O Capítulo 5 apresenta uma discussão, comentários e observações finais, reunindo os achados e conclusão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

No sistema nervoso central a interpretação dos estímulos sensoriais muda constantemente nos ambientes naturais e o comportamento adaptativo dos animais depende de sua capacidade de modular dinamicamente a codificação de estímulos relevantes [Simões et al., 2020]. Mais especificamente, durante a percepção auditiva, a atividade coordenada das redes neurais, que codificam estímulos acústicos, resulta em padrões oscilatórios eletrofisiológicos [Rees et al., 1986].

As oscilações neurais na via auditiva, e mais especificamente no IC, podem ser conduzidas pelo envelope de um tom modulado em amplitude [Lockmann et al., 2017, Simões et al., 2020]. Além disso, após uma tarefa de aprendizagem associativa na qual o estímulo auditivo é pareado com um estímulo aversivo, a dinâmica temporal da atividade neural pode mudar substancialmente. A fase de oscilação evocada acopla-se à fase do tom modulado em amplitude e a sua potência espectral aumenta significativamente com a reapresentação do estímulo auditivo [Lockmann et al., 2017, Simões et al., 2020]. Sendo assim, em linhas gerais, o aprendizado associativo modifica a resposta oscilatória estimulada no IC, de modo que tal estrutura passa a oscilar de forma significativa na mesma frequência da modulação do estímulo sonoro. Além do IC, outras estruturas participam do processamento sensorial, como as amígdalas lateral e basolateral, o córtex pré-frontal pré-límbico e o córtex pré-frontal infra-límbico, que processam reações frente ao estresse, e que em linhas gerais modulam o comportamento condicionado. [Likhtik et al., 2014].

2.1 Condicionamento ao medo

O medo é um mecanismo de defesa inato, evolutivamente bem preservado, desencadeado por estímulos que representam perigo. Enquanto alguns estímulos são naturalmente capazes de desencadear uma resposta defensiva, outros podem ser aprendidos de forma rápida e duradoura. Esse aprendizado permite que os seres vivos criem adaptações às contínuas mudanças impostas pelo ambiente [Kim and Jung, 2006].

As bases biológicas relacionadas ao medo foram largamente estudadas através de tarefas comportamentais, como o condicionamento clássico ou Pavloviano [Rogan et al., 1997]. No condicionamento ao medo Pavloviano, um estímulo emocionalmente neutro (condicionado) é apresentado em conjunto (pareado) a um estímulo aversivo (não condicionado). Esse estímulo aversivo, por sua vez, ativa de forma reflexa respostas não condicionadas, inatas, de fuga ou luta [Watson and Rayner, 1920]. Após um ou diversos pareamentos entre os estímulos, uma robusta memória associativa é criada, tornando o estímulo condicionado capaz de desencadear as mesmas respostas reflexas que tipicamente

ocorreriam na presença do perigo [Kim and Jung, 2006].

Paradigmas de condicionamento clássico ao medo tipicamente utilizam pequenos animais (roedores como ratos e camundongos) como sujeitos experimentais. Em contingências bem controladas, o pareamento temporal entre estímulos condicionados (contexto, luz ou som) à estímulos não condicionados (choque na pata) gera robustas respostas condicionadas [Kim and Jung, 2006].

Esses paradigmas são excelentes ferramentas para o estudo das interações entre as redes neurais reverberantes [Likhtik et al., 2014]. Essas interações são caracteristicamente plásticas, duradouras e expressadas através de respostas comportamentais estereotipadas, como a exemplo do comportamento de congelamento (*Freezing*) [S. Fanselow, 1984].

2.2 Processamento sensorial na via acústico-límbica

O primeiro estágio da codificação sensorial ocorre nos receptores sensoriais. Esses receptores, através de alterações de seus potenciais elétricos transmembrânicos, geram sinais ou disparos de potenciais de ação. Esses sinais são transmitidos por vias ascendentes e traduzem a intensidade dos estímulos por meio de diferentes frequências [Adrian, 1928]. Algumas características dos estímulos recebidos são processadas em estruturas iniciais ao longo da via sensorial [Bensmaia et al., 2008]. Estas estruturas, por sua vez, são alvos de projeções eferentes robustas, advindas de substratos cerebrais de processamento superior [Bajo and King, 2013].

Contudo, evidências sugerem que a mera codificação pela frequência não leva em consideração importantes atributos, dentre eles a sincronização e a temporização das respostas neuronais [Laurent et al., 1996]. Esses atributos são necessários para o adequado processamento e representação da informação propagada [Stein et al., 2005].

Sabe-se que o processamento de estímulos externos pode variar de uma apresentação para outra dependendo da temporização das atividades oscilatórias intrínsecas do sistema neural. Os estados de funcionamento cerebrais, modulados por estruturas cerebrais mais rostrais, são tidos como aspectos importantes da integração sensorial e podem ser desencadeados pelo próprio estímulo externo, gerados por padrões endógenos ou dinamicamente formados por processos de aprendizagem [Engel et al., 2001].

O colículo inferior é o principal núcleo do tronco cerebral na via auditiva, pois converte a maior parte das informações auditivas ascendentes [Ledoux et al., 1987] e também é alvo de projeções de retroalimentação de estruturas cerebrais de processamento polimodal complexo [Bajo et al., 2010]. As estruturas da via auditiva que projetam de volta para o CI incluem o córtex auditivo [Winer et al., 2002] e o núcleo basal da amígdala (BLA) [Marsh et al., 2002]. Este último é conhecido por estar crucialmente envolvido no

condicionamento ao medo, sendo um detector seletivo de estímulos do ambiente [Rogan et al., 1997].

O Córtex Pré-Frontal é reconhecido como um dos principais substratos modulatórios da resposta comportamental [Bechara et al., 2000]. Esta modulação protege frágeis representações neurais de interferências provenientes tanto de distrações externas quanto internas.

No condicionamento ao medo, evidências demonstraram que o Córtex Pré-Frontal modula dinamicamente o complexo amigdalóide. Essa modulação pode ser positiva ou negativa, facilitando [Karalis et al., 2016] ou inibindo [Quirk et al., 2006] respostas condicionadas. A facilitação ou inibição pode ser considerada uma forma eficiente de processamento paralelo, uma vez que previne interferências na contingência pré-estabelecida durante o condicionamento.

2.3 Técnicas de análise

Diversas técnicas são usadas para análise de dados eletrofisiológicos, ou para análise de sistemas dinâmicos não-lineares. Técnicas baseadas no domínio da frequência são bastante utilizadas para se decompor o sinal em componentes de frequências, as quais podem indicar a presença de fenômenos ou comportamentos apenas pela presença de energia em alguma componente de frequência específica [Oppenheim et al., 1997]. Já outras técnicas fazem uso de ferramentas matemáticas com o objetivo de modelar ou identificar comportamentos observáveis no mundo real, como o sincronismo entre dois sinais ou sistemas. Dentre os sistemas dinâmicos não-lineares, a classe denominada atratores estranhos geralmente é analisada utilizando mapas de estados, teoria da informação e modelagem [Aguirre, 2022]. Algumas técnicas espectrais são reproduzidas neste trabalho, bem como uma análise de sincronismo. A modelagem de sistemas dinâmicos não-lineares foi feita e são mostradas as técnicas de modelagem e os critérios de informação utilizados. Abaixo, as técnicas utilizadas são descritas brevemente, com o intuito de contextualizar a aplicação e as características de cada uma.

2.3.1 Transformada de Fourier rápida

Um dos algoritmos mais utilizados em processamento de sinais, a FFT, é um algoritmo eficiente para se calcular a Transformada de Fourier discreta. A Transformada de Fourier converte um sinal de seu domínio original (espaço ou tempo) para o domínio da frequência. Isso ocorre decompondo uma sequência de valores em componentes de frequência, com a frequência máxima sendo a frequência de Nyquist (metade da frequência de amostragem) [Oppenheim et al., 1997]. Uma das limitações é que, embora seja possível

observar não-linearidades, em caso de outras componentes de frequência apresentarem uma amplitude significativa no resultado da Transformada de Fourier, não é possível distinguir tais não-linearidades de respostas lineares de outros atributos desconhecidos.

2.3.2 Espectrograma

O espectrograma é uma aplicação da FFT, sendo representação visual da intensidade do espectro de frequência de um sinal em função do tempo. Suas aplicações são diversas e consistem em: análise de fala e reconhecimento de voz, análise de música e reconhecimento de padrões musicais, monitoramento ambiental, análise de sinais de radar e sonar, análise eletrofisiológica, dentre outras. O algoritmo consiste na renderização da Transformada de Fourier de tempo curto (*Short-Time Fourier Transform* - STFT) em um gráfico tridimensional, cujos eixos são: tempo, frequência e amplitude. Em resumo, o espectrograma é uma ferramenta importante para analisar a frequência e a intensidade de um sinal ao longo do tempo [Oppenheim, 1970].

2.3.3 Agrupamento Médio de Fase

Diferente do sincronismo completo, que é quando dois sistemas possuem exatamente os mesmos estados ao longo do tempo, o sincronismo de fase é comumente encontrado na natureza. Diz-se que dois sistemas oscilantes estão sincronizados em fase quando a diferença de fase entre eles é constante, dentro de uma margem de erro [Aguirre, 2022].

O MPC (do Inglês - Mean Phase Clustering) é comumente utilizado para identificar o sincronismo de fase em sinais com ruído considerável, utilizando como métrica o sincronismo médio de fase [Joris et al., 2004, Johansson, 1999, Lachaux et al., 1999].

A técnica consiste em quantificar um agrupamento médio de fase, com faixa de valor unitária, onde um valor unitário significa sincronismo médio perfeito e valor nulo significa inexistência de sincronismo. O cálculo da fase de um sinal oscilatório unidimensional é feito utilizando a transformada de *Hilbert*, cuja base matemática pode ser encontrada em [Johansson, 1999]. Para simplificar, a transformada de *Hilbert* de um sinal x será representada por $\text{hilbert}(x)$.

Assim sendo, a fase de um sinal oscilatório pode ser calculada pela Equação 2.1. O agrupamento de fase médio (MPC) entre dois sinais, x e y é dada pelo módulo do número complexo \bar{Z} da Equação 2.2 e a fase média é fase desse número complexo (Equação 2.3), onde N é o número de amostras dos sinais [Cohen, 2014].

$$\phi_x = \text{atan2}(\text{Im}\{\text{hilbert}(x)\}, \text{Re}\{\text{hilbert}(x)\})$$

$$\text{atan2}(y, x) = \begin{cases} \arctan\left(\frac{y}{x}\right) & \text{se } x > 0, \\ \arctan\left(\frac{y}{x}\right) + \pi & \text{se } x < 0 \text{ e } y \geq 0, \\ \arctan\left(\frac{y}{x}\right) - \pi & \text{se } x < 0 \text{ e } y < 0, \\ +\frac{\pi}{2} & \text{se } x = 0 \text{ e } y > 0, \\ -\frac{\pi}{2} & \text{se } x = 0 \text{ e } y < 0, \\ \text{indefinido} & \text{se } x = 0 \text{ e } y = 0. \end{cases} \quad (2.1)$$

$$\bar{Z} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N e^{j \cdot (\phi_x - \phi_y)} \quad (2.2)$$

$$\text{MPC}_{xy} = |\bar{Z}|$$

$$\bar{\theta}_{xy} = \angle \bar{Z} \quad (2.3)$$

2.3.4 Análise Espectral De Alta Ordem No Domínio Do Tempo

A Equação 2.4 [Furtado Boreli, 2018] apresenta a formulação do quadrispectro no domínio do tempo, que contém os espectros de ordem inferiores, ou seja, o espectro $S(\Omega)$, bispectro $B(\Omega)$ e trispectro $T(\Omega)$, e pode ser expandida facilmente adicionando termos de ordem superiores. Denota-se o operador esperança como sendo $\langle \cdot \rangle$. Na Equação 2.4, é mostrado como é fácil a expansão para espectros de ordens superiores, de forma que o cálculo do pentispectro consiste na adição do termo $\max_{\phi} \langle S^5 P \rangle$ e assim por diante.

$$\begin{aligned} Q(\Omega) &= \max_{\phi} \langle SP \rangle \max_{\phi} \langle S^2 P \rangle \max_{\phi} \langle S^3 P \rangle \max_{\phi} \langle S^4 P \rangle \\ &= S(\Omega) \max_{\phi} \langle S^2 P \rangle \max_{\phi} \langle S^3 P \rangle \max_{\phi} \langle S^4 P \rangle \\ &= B(\Omega) \max_{\phi} \langle S^3 P \rangle \max_{\phi} \langle S^4 P \rangle \\ &= T(\Omega) \max_{\phi} \langle S^4 P \rangle, \end{aligned} \quad (2.4)$$

onde o termo $\max_{\phi} \langle S^n P \rangle$ é o par amplitude e fase de cada frequência. A fase ϕ é aquela que maximiza a amplitude do estimador de esperança do produto entre o sinal de inspeção ($P = \cos(2\pi\Omega t + \phi)$) e a potenciação de grau n do sinal analisado (S^n).

As vantagens de se usar a TDHOSA no lugar da HOSA são:

- fácil interpretação dos resultados, uma vez que os resultados gerados são bidimensionais;

- fácil escalabilidade para espectros de ordem superior e informações dos espectros de ordem inferior;
- robustez ao ruído gaussiano;
- não é necessário parametrizar o método, apenas definir a banda de inspeção e o passo de varredura.

As duas desvantagens existentes, sendo a primeira delas a mais relevante, são listadas a seguir:

- alto custo computacional (algoritmo exaustivo);
- em caso de mais de um acoplamento, não é simples identificar quais frequências o causaram.

A motivação geral por trás do uso do HOSA/TDHOSA no processamento de sinais é [Nikias and Raghuvver, 1987]:

- extrair informações devido a desvios de gaussianidade (normalidade);
- estimar a fase de sinais paramétricos não Gaussianos;
- detectar e caracterizar as propriedades não lineares de mecanismos que geram séries temporais via relação de fase de seus componentes harmônicos.

A propriedade de destaque dos processos Gaussianos é que todos os poliespectros de ordem maior que dois são nulos [Furtado Boreli, 2018, Lainscsek and Sejnowski, 2015]. Ressalta-se que a HOSA/TDHOSA preserva as informações de fase de sinais paramétricos não gaussianos. Nesse sentido, o objetivo é investigar a diferença entre excitações independentes e acoplamentos não lineares de excitações lineares. Para essa finalidade, é estudado o bispectro, trispectro e quadrispectro, com a intenção de identificar acoplamentos quadráticos, cúbicos e quárticos.

Para validar e observar as características do TDHOSA, um sinal teórico foi criado conforme Equação 2.5, sendo $\omega_i = 2\pi f_i$ (veja a Tabela 1). Os espectros de alta ordem (espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro) do sinal puro e do sinal com ruído também foram gerados e aqueles sem ruído são mostrados na Figura 1 e com ruído na Figura 2.

$$y(t) = \cos([\omega_2 + \omega_4]t) + \cos([\omega_1 + \omega_2 + \omega_4]t) + \sum_{i=1}^5 a_i \cos(\omega_i t) \quad (2.5)$$

i	Frequência f_i [Hz]	Amplitude a_i
1	9	1,05
2	12	1,15
3	19	0,8
4	29	0,7
5	61	0,93

Tabela 1 – Frequência a amplitudes principais do sinal teórico da Equação 2.5.

Para o espectro, cada parcela somada no sinal aparece na forma de um pico, inclusive as parcelas com frequências acopladas. Nos espectros de alta ordem, bispectro, trispectro e quadrispectro, somente as frequências que possuem acoplamento e os próprios acoplamentos aparecem, ou seja, somente as parcelas que contribuem para a não-linearidade do sinal são detectadas nos espectros de alta ordem. Embora as amplitudes do espectro não correspondam diretamente às amplitudes do sinal, a proporção entre elas se mantêm. Para os espectros de alta ordem, a partir do bispectro, a proporção se mantêm entre si, mas a amplitude se altera consideravelmente de acordo com a taxa de variação de um espectro de alta ordem para o outro espectro de ordem superior. Em resumo, se a amplitude de um espectro de alta ordem é menor do que 1, a amplitude converge para zero à medida que a ordem dos espectros aumenta. Caso as amplitudes dos espectros de alta ordem seja maiores do que 1, a amplitude tende divergir para $+\infty$. Para o caso sem ruído, o uso de espectros acima do bispectro parece redundante, porém, ao se adicionar ruído, as vantagens de se usar os espectros de ordem superiores se justificam, como pode ser visto na Figura 2.

Como já mencionado, a Figura 2 mostra o espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do sinal da Equação 2.5, com um ruído branco gaussiano de média nula e desvio padrão igual ao do sinal adicionado. Com o acréscimo do ruído gaussiano, o espectro do sinal passou a apresentar artefatos espúrios em todo o espectro de frequência, por se tratar de um ruído branco. O bispectro atenua consideravelmente esse ruído, enquanto no trispectro e no quadrispectro, a presença de ruído é quase imperceptível. Isso se dá pela propriedade de que sinais gaussianos são nulos em espectros de alta ordem, por definição. Computacionalmente, isso não ocorre de forma perfeita, como é visto no bispectro, que ainda possui vestígios do ruído gaussiano, mas o uso do trispectro e quadrispectro mostram que é possível isolar as frequências não-lineares das frequências lineares e do ruído.

É importante notar que para o caso com ruído (Figura 2), as frequências que deveriam ser nulas a partir do bispectro, ainda aparecem, de forma quase imperceptível no bispectro e quadrispectro, mas perceptível no trispectro, o que indica que, embora a TDHOSA seja robusta a ruídos gaussianos, a técnica não os elimina completamente. Portanto, para se determinar a relevância de um pico de frequência, é importante observar todos os espectros simultaneamente, não somente um deles, com o objetivo de evitar conclusões errôneas por conta de ruídos e erros sistemáticos de arredondamento, precisão

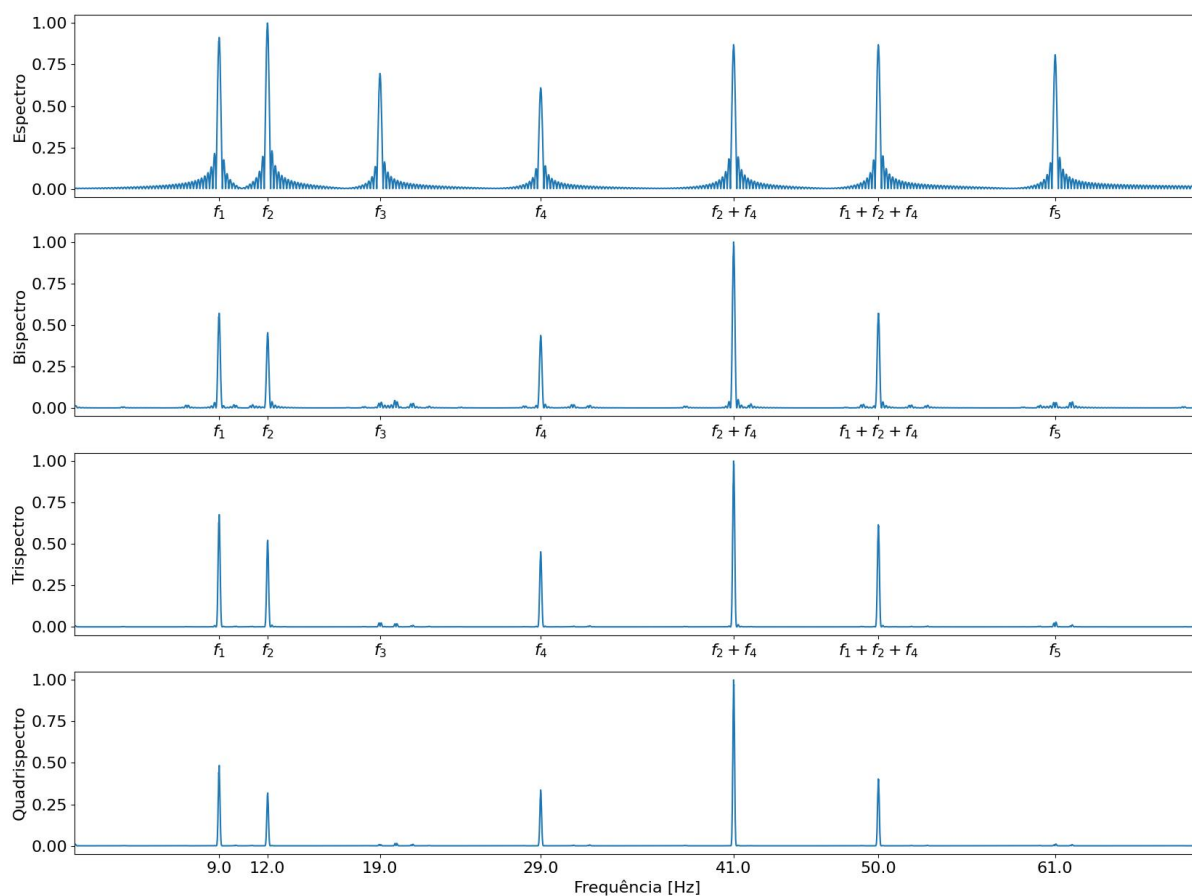


Figura 1 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do sinal teórico sem ruído.

e etc.

O sinal que foi utilizado para validar a TDHOSA é analítico e possui mais de um acoplamento de frequência, porém, na prática, não é possível determinar a quantidade de frequências que se acoplam, e quais frequências se acoplam entre si somente com o uso da TDHOSA, portanto, a técnica permite apenas indicar quais frequências possuem acoplamentos não-lineares, não permitindo a identificação dos mesmos.

2.4 Técnicas de Modelagem

2.4.1 Modelagem - Modelos Paramétricos Polinomiais

A análise utilizando modelos polinomiais não-lineares foi feita com a intenção de se obter informações através dos dados utilizados para regressão do modelo, como a seleção de regressores, critérios de informação e desempenho do modelo, a fim de se observar

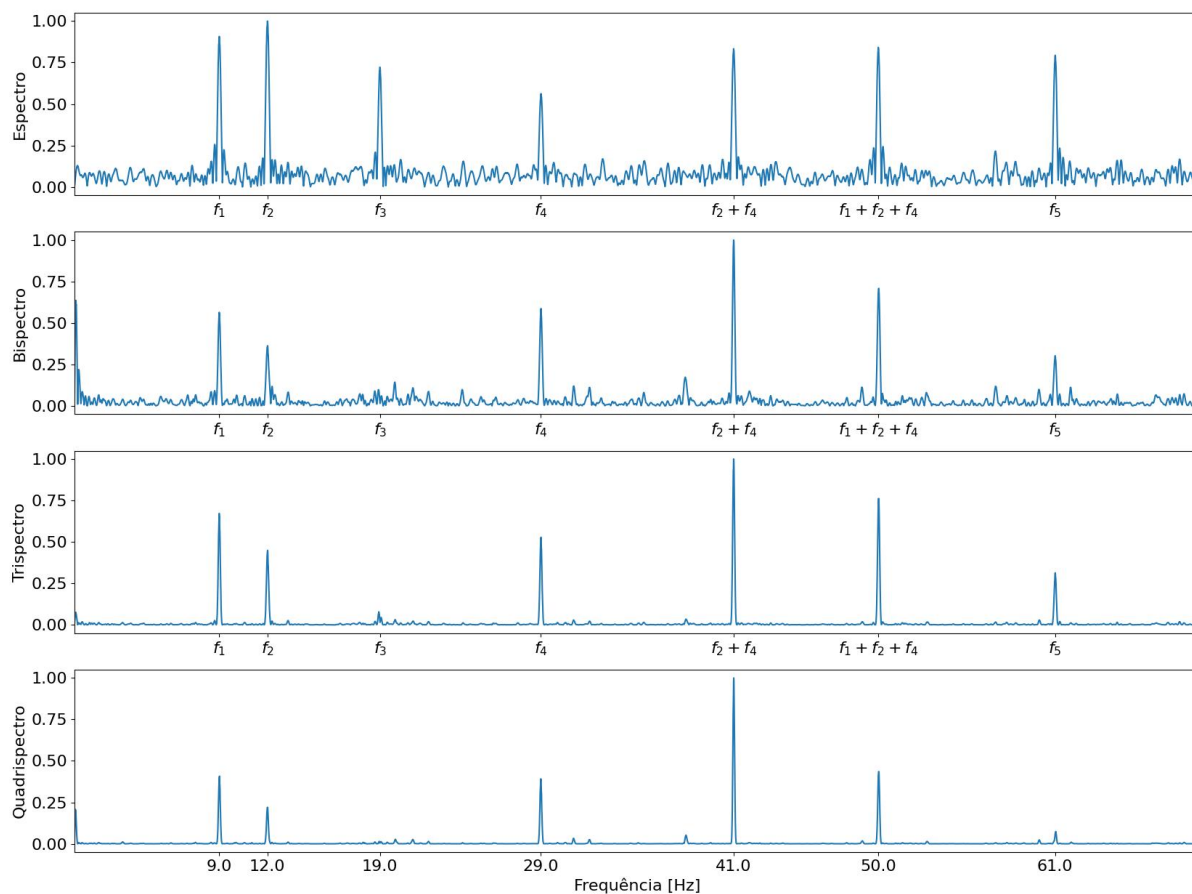


Figura 2 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do sinal teórico com ruído gaussiano de média nula e com mesmo desvio padrão do sinal puro.

relações dinâmicas entre os sinais medidos e as respostas evocadas.

De acordo com [Aguirre \[2015\]](#), os objetivos de se utilizar modelagem polinomial não-linear são:

- determinar modelos que representam bem os sinais medidos;
- obtenção de relação entre substratos cerebrais observando os termos cruzados dos sinais utilizados em modelos com boas respostas;
- determinar estruturas mínimas de modelos que apresentam boas respostas se comparado com os dados medidos;
- obter dados provenientes dos critérios de informação, indicando quais substratos cerebrais são mais relevantes nas respostas evocadas de interesse, utilizadas como saída do modelo.

Para a estimação de modelos, primeiramente, define-se a estrutura dos modelos como sendo da família NARX (*Non-linear Auto-Regressive with eXogenous input* - Não-linear auto-regressivo com entrada externa). O motivo para tal escolha é que os modelos dessa família conseguem representar não-linearidades de sistemas com entradas externas, sem a necessidade de algoritmos recursivos ou iterativos para a estimação de parâmetros, uma vez que a análise da dinâmica dos sinais obtidos pelos modelos é qualitativa e a possível polarização dos estimadores não justifica o aumento da complexidade dos algoritmos para mitigá-la.

Para a seleção dos regressores para cada modelo, são usados os seguintes critérios: Taxa de redução de erro (ERR) para a ordenação dos regressores em termos de relevância na redução de erro, e o Critério de Informação de Akaike, para definir a quantidade de regressores ordenados, de modo a evitar a sobre parametrização do modelo, uma vez que isso tem impactos negativos no desempenho computacional e também pode resultar na piora da resposta do modelo, se comparado com um modelo bem parametrizado [Aguirre \[2015\]](#).

2.4.2 Modelo Não-Linear Auto Regressivo com Estímulo Exógeno (NARX)

Os modelos paramétricos não-lineares da classe NARX são modelos que possuem estímulo externo modelado, bem como os termos auto-regressivos, utilizando regressores lineares e não-lineares. Para tais modelos, faz-se uso de regressores lineares e combinações não-lineares dos mesmos. A classe de modelos NARX é uma subclasse dos modelos NARMAX, sem a modelagem dos termos de ruído do modelo. Uma representação matemática dos modelos NARX é mostrada na Equação 2.6 [\[Aguirre, 2015\]](#).

$$y(k) = \sum_i c_i \prod_{j=1}^{n_y} y(k-j) \prod_{r=1}^{n_u} u(k-r) \quad (2.6)$$

2.4.3 Taxa de Redução de Erro

O critério de Taxa de Redução de Erro (*Error Reduction Rate* - ERR) é utilizado para ordenar os regressores de um modelo, no caso, um modelo de estrutura NARX, de acordo com a redução da variância dos resíduos normalizados de acordo com a variância da saída do modelo, ao se inserir tal regressor no modelo. O ERR pode ser representado pela Equação 2.7 [\[Aguirre, 2015\]](#):

$$[ERR]_i = \frac{\hat{g}_i^2 \langle \mathbf{w}_i, \mathbf{w}_i \rangle}{\langle \mathbf{y}, \mathbf{y} \rangle}, \quad i = 2, 3, \dots, n_\theta, \quad (2.7)$$

onde \mathbf{w}_i é o i -ésimo regressor ortogonalizado e \hat{g}_i^2 é o parâmetro estimado para tal regressor. Assim sendo, o algoritmo consiste na adição do regressor com o maior ERR dentre os candidatos, e a ordem de inserção é gravada para a ordenação. Portanto, com a ordenação dos regressores feita, é possível determinar uma prioridade na ordem de seleção dos regressores que irão compor o modelo, porém, ainda existe o problema de se determinar a quantidade dos regressores. Neste trabalho, tal problema é resolvido com o uso do Critério de Informação de Akaike, embora outras abordagens sejam possíveis, como por exemplo, o erro final de predição (FPE) e critério de informação de Bayes (BIC).

2.4.4 Critério de Informação de Akaike

O Critério de Informação de Akaike (*Akaike Information Criterion* - AIC) é definido como [Aguirre, 2015]:

$$AIC(n_\theta) = N \ln [\sigma_{erro}^2(n_\theta)] + 2n_\theta, \quad (2.8)$$

sendo N a quantidade de amostras, $\sigma_{erro}^2(n_\theta)$ a variância dos resíduos e n_θ a quantidade de parâmetros do modelo. Desse modo, o AIC permite quantizar a redução da variância dos resíduos do modelo, enquanto penaliza a inclusão de cada regressor. Dessa forma, a cada regressor incluído no modelo, é possível determinar se a inclusão é justificada pela redução do erro em contraponto ao custo de se incluir esse regressor no modelo, evitando uma possível sobre-parametrização do modelo. O resultado do AIC consiste tipicamente em um gráfico cujo eixo horizontal consiste em números inteiros que determinam a quantidade de parâmetros do modelo, e o eixo vertical consiste no AIC para a quantidade de regressores correspondente. Como os regressores são previamente ordenados pelo ERR, espera-se que o AIC consista em uma curva descendente (embora nem sempre seja o caso), e a quantidade de termos que recomenda-se escolher é aquela a qual o AIC apresentou comportamento decrescente, e seja um primeiro mínimo local da curva. Em resumo, o ponto de parada do AIC é aquele onde o último regressor adicionado possui uma redução significativa no AIC e sua adição significa uma melhoria considerável na saúde estatística do modelo.

3 METODOLOGIA

3.1 Contextos experimentais

O presente trabalho fez uso de duas bases de dados. A primeira publicada e disponibilizada por [Simões et al. \[2020\]](#) e uma segunda que ainda em esta processo de coleta. A segunda são dados relativos à pesquisa pós-doutoral do Doutor Flávio Afonso Gonçalves Mourão, junto ao Núcleo de Neurociências da UFMG, sob a supervisão do Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes.

Os dados apresentados em [[Simões et al., 2020](#)] consistem em dois sinais, um registro relativo ao estímulo sonoro e o outro ao potencial de campo local registrado no IC de ratos da linhagem Wistar, submetidos a tarefa de condicionamento ao medo. Por sua vez, os dados não publicados da segunda base consistem de registros eletrofisiológicos de três diferentes substratos cerebrais que compõe a via acústico límbica, como o Colículo Inferior, o Complexo Amigdalóide e o Córtex Pré-frontal Medial. Nesse caso, os registros foram realizados em camundongos da linhagem C57/BL6J, também submetidos ao mesmo protocolo de condicionamento ao medo.

A presente dissertação fará uso de apenas 1 animal experimental de cada base de dados, por se tratar de uma análise qualitativa e pela disponibilidade de dados limitada. Animais foram selecionados de acordo com a qualidade do sinal registrado, resposta evocada no colículo inferior e resposta comportamental condizente com o protocolo de condicionamento ao medo proposto.

3.2 Sujeito experimental

Ambas as linhagens de roedores utilizadas nas bases de dados são provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde foram alimentados com ração balanceada padrão e água *ad libitum*, permanecendo alocados em gaiolas tamanho padrão com temperatura ambiente controlada de aproximadamente 22°C e foto período de 12h claro/escuro. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (base de dados 1 - Protocolo: 360/2015; Base de dados 2 - Protocolo: 198/2019).

3.3 Protocolo Cirúrgico

De acordo com as informações coletadas, em ambas as bases de dados os animais foram submetidos a uma cirurgia para o implante de eletrodos de registro seguindo procedimentos semelhantes.

Os animais foram anestesiados com Isoflurano em Oxigênio, em concentrações de 2 a 4% para indução e 0,5 a 2,0% para manutenção. Após a ausência de reflexos e sinais de dor, a superfície da cabeça foi raspada e o animal foi posicionado em um suporte estereotáxico (Estereotáxico Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). O fluxo constante de anestésico foi administrado por meio de uma máscara customizada e impressa em 3D (<https://github.com/fgmourao>). Após a assepsia com álcool (70%, tópico) e solução de povidona-iodo (7,5%, tópico), foi aplicada anestesia local com cloridrato de lidocaína-epinefrina [1% (peso/volume), 7 mg/kg], e o couro cabeludo foi removido para expor o crânio.

Pequenos furos na parte superior do crânio foram feitos com uma broca de 0,5 mm, de acordo com as coordenadas estereotáxicas previamente estabelecidas.

Base de dados 1: - Colículo Inferior esquerdo, referência a partir do bregma: AP: -9 LL: 1, 4, DV: -4. [Paxinos and Watson, 2007, Simões et al., 2020].

Base de dados 2: - Colículo Inferior direito, referência a partir do bregma: AP: -5, 10 LL: 1, DV: -2; Complexo basolateral da amígdala, referência a partir do bregma: AP: -2, LL: +3, 15, DV: -3, 4; Córtex pré-límbico e infra-límbico, referência a partir do bregma: AP: 1, 54, LL: 0, 6, DV: -3, 2(IL)/-2, 4(PL) [Paxinos and Watson, 2007].

Para a base de dados 1 o eletrodo foi confeccionado com fios de aço inoxidável, revestidos com teflon (0,005 pol., Modelo 791400, AM Systems Inc., Carsborg, WA, Estados Unidos), soldado em um conector RJ-45.

Para a base de dados 2 os eletrodos são de tungstênio (Blunt tungst electr, 3Meg, 0.008in,pkg/12), soldados em uma placa de circuito impresso, que por sua vez é soldada em um micro conector adaptado [Mourão et al., 2022].

Em ambos os casos, dois parafusos de aço inoxidável foram implantados no lado contralateral, um como o eletrodo de referência (0 V) e outro como o terra, sendo soldados aos conectores através de fios de aço inoxidável, revestidos com teflon (0,005 pol., Modelo 791400, AM Systems Inc., Carsborg, WA, Estados Unidos). Os conectores são fixados no crânio com cimento de zinco e posteriormente revestidos com acrílico odontológico.

Ao final, os animais são tratados com solução penta-biótica (17 mg/kg), anti-inflamatória (5 mg/kg) intramusculares e solução opiácea (20 mg/kg), seguindo para um período de recuperação de 5 a 7 dias.

3.4 Estímulo auditivo

O estímulo sonoro utilizado foi um tom puro de 10 kHz com sua amplitude modulada por uma onda senoidal de 53,7 Hz - referida como envelope de amplitude ou envoltória [Simões et al., 2020, Lockmann et al., 2017]. A frequência do envelope de amplitude foi escolhida de modo que a janela de análise espectral contenha aproximadamente um número inteiro de ciclos, mitigando assim o vazamento espectral [Felix et al., 2005]. A intensidade do estímulo é ajustada para ~ 80 dB SPL [Meeren et al., 2001].

3.5 Protocolo de condicionamento ao medo auditivo

O protocolo de condicionamento ao medo auditivo (*auditory fear conditioning* - AFC) aplicado em ambas as bases de dados foi constituído de três fases distintas: habituação, treino e teste. Durante as sessões de habituação, os animais são manipulados pelo experimentador durante cinco dias em um intervalo de cinco minutos. Ainda durante a fase de habituação, após o período de manipulação, os animais são ligados ao sistema de registro, apresentados ao contexto A, durante cinco minutos para livre exploração, onde são submetidos a cinco estímulos auditivos com duração de 30 s de duração, com intervalos aleatórios entre os estímulos. A fase de treino ocorre 24 h após a habituação, onde os animais são posicionados no contexto B e recebem cinco estímulos auditivos (com as mesmas características dos estímulos da fase de habituação), além de cinco choques elétricos nas patas (amplitude de 0,4 mA, com duração de 2 s de acordo com a base de dados 1 e amplitude de 0,7 mA com duração de 2 s de acordo com a base de dados 2. Ambos os casos pareado com o estímulo auditivo, aos dois segundos finais do intervalo de 30 s [Amaral-Júnior et al., 2019].

Durante as vinte e quatro horas seguintes os animais são realocados em suas caixas e ao final, seguem novamente para a tarefa, sendo novamente ligados ao sistema de registro. Enquanto os sinais eletrofisiológicos são novamente registrados, os animais são reexpostos ao contexto A, obedecendo os mesmos critérios quanto a apresentação dos estímulos conforme a fase de habituação [Rogan et al., 1997, Lockmann et al., 2017].

O comportamento de congelamento foi definido como a ausência de movimentos, exceto a respiração, por um mínimo de 3 segundos [Curzon et al., 2009].

A Figura 3 apresenta um diagrama do AFC.

3.6 Registro eletrofisiológico

Os registros eletrofisiológicos foram realizados em diferentes sistema de aquisição digital de sinais. Na base de dados 1 os sinais foram obtidos por meio de um sistema da

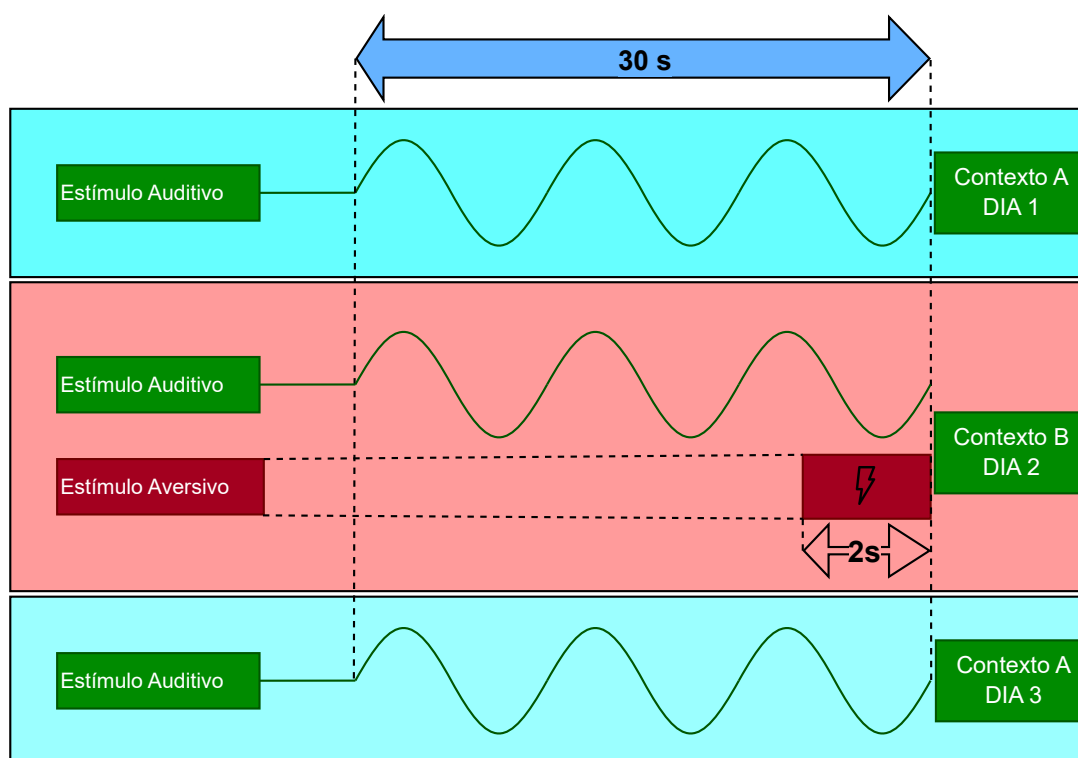


Figura 3 – Diagrama do experimento de biológico.

Tucker-Davis Technologies (TDT RZ2 BioAmp Processor e PZ2 Preamplifier), filtrados entre 1 e 300 Hz, amplificados em 24.000 V/V e amostrados a uma frequência de amostragem de aproximadamente 3kHz. Na base de dados 2 os sinais foram obtidos através de uma plataforma de aquisição customizada [Mourão et al., 2022] baseada nos amplificadores *Intan* e no sistema da *Open Ephys* [Siegle et al., 2017]. Os sinais foram filtrados de 1 a 7500 Hz, multiplexados e digitalizados a uma frequência de amostragem de 30 kHz por canal.

3.7 Pós-Processamento e análise dos registros eletrofisiológicos

Os registros foram processados e analisados por rotinas customizadas escritas em Python e em MATLAB [Anjos, 2023b] e consistiu inicialmente na análise visual dos mesmos, para identificar problemas no processo de medição, além de identificar as janelas de tempo em que os eventos ocorreram.

3.7.1 Filtragem

Os sinais foram coletados com uma taxa de amostragem relativamente alta (1 kHz) para a ordem de grandeza da frequência em que se espera observar algum tipo de pico de energia nas estruturas cerebrais (entre 4 e 60 Hz, bandas θ e γ , principalmente 53, 71 Hz).

Em algumas das análises, não foi necessária a filtragem do sinal, como a FFT e TDHOSA, uma vez que os resultados são fornecidos no domínio da frequência e frequências indesejadas podem ser ignoradas. Em outras análises, como o MPC, o sinal foi filtrado por um filtro passa-faixas em torno de uma frequência de interesse. A Figura 4 mostra a resposta em frequência de um filtro *Butterworth* de quarta ordem utilizado para o MPC, de modo a isolar a faixa em torno na frequência moduladora do sinal auditivo condicionado (53.71 ± 2 Hz), nos sinais medidos. Em todos os casos, foram realizadas filtragens digitais de fase nula (*zero-phase digital filtering*) de modo a evitar distorção de fase.

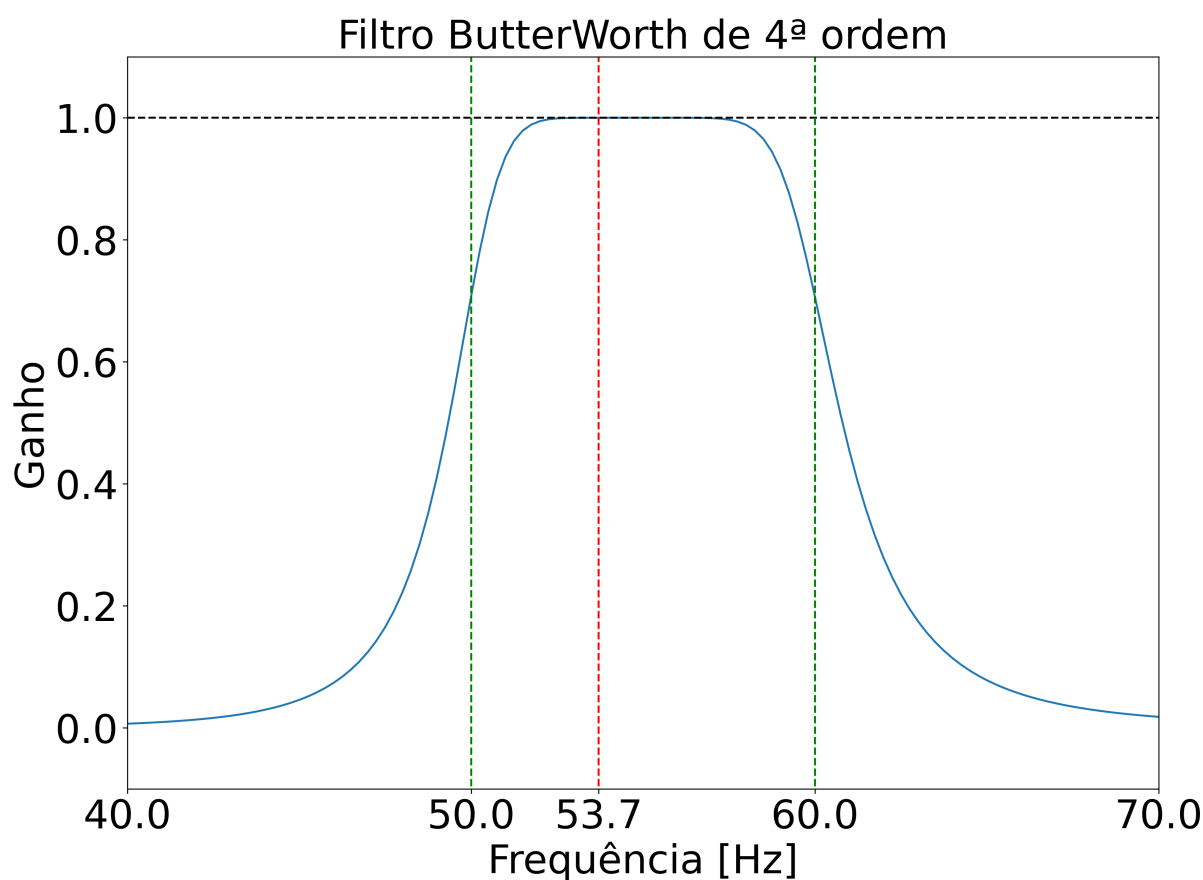


Figura 4 – Filtro passa faixas para análise de sincronismo de fase. As linhas verticais tracejadas indicam a banda de corte do filtro.

3.7.2 Decimação

Os dados coletados foram sobre-amostrados e precisam ser decimados, para a remoção de componentes de altas frequências espúrias, bem como viabilizar a execução dos algoritmos computacionalmente, cujo custo computacional é proporcional à quantidade de amostras que são processadas. A decimação pode ser feita de duas formas:

1. Fatiamento dos *arrays*: Essa técnica de decimação é usada quando se filtra o sinal, de modo que a decimação consiste apenas na seleção de amostras cujo índice é múltiplo

do fator de decimação. O Código 3.1 mostra uma decimação por um fator de 5 de um sinal filtrado x , representado por um *Numpy.ndarray*.

Código 3.1 – Decimação feita utilizando fatiamento de um *Numpy.ndarray*.

```
decimation_factor: int = 5
decimated_x = x[::decimation_factor]
```

2. Função *decimate* da biblioteca *Signal* do Pacote *Scipy* para *Python*:

A função *decimate* da biblioteca *Signal* do Pacote *Scipy* é usada para a decimação com filtro *antialiasing* em batelada de uma matriz onde cada linha corresponde a uma amostra e cada coluna representa um canal medido. Como são coletados 16 canais simultaneamente, para análises em que não é necessário filtrar os sinais, essa forma de decimação é a mais eficiente. O Código 3.2 mostra um exemplo de como decimar uma matriz cujos sinais são colunas e as linhas são amostras.

Código 3.2 – Decimação feita utilizando o método *decimate* da biblioteca *Python Scipy*.

```
from scipy import signal

decimation_factor: int = 5

x_decimated = signal.decimate(
    x=x,                # signal
    q=decimation_factor, # decimation factor
    n=20*decimation_factor, # filter order
    ftype="fir",        # filter type
    axis=1,             # axis to decimate
    zero_phase=True     # zero-phase filtering
)
```

Uma rotina específica é utilizada para se decimar um *dataframe Pandas* de uma única vez, aplicando o método *decimate* da biblioteca *Signal* do Pacote *Scipy*, de modo que todas as colunas numéricas do *dataframe* que precisam de ser decimadas são processadas em batelada. A frequência de amostragem após a decimação é 250 Hz.

3.7.3 Seleção de eventos

A seleção de eventos consiste na extração dos dados onde ocorre a reprodução do estímulo auditivo, que geralmente possui aproximadamente 30 s de duração.

A detecção de eventos é feita através de uma rotina que processa o estímulo auditivo, de modo que os instantes de tempo em que o som começa e termina, são aproximados, permitindo a identificação automática dos mesmos. A Figura 5 mostra as etapas usadas para se identificar os eventos.

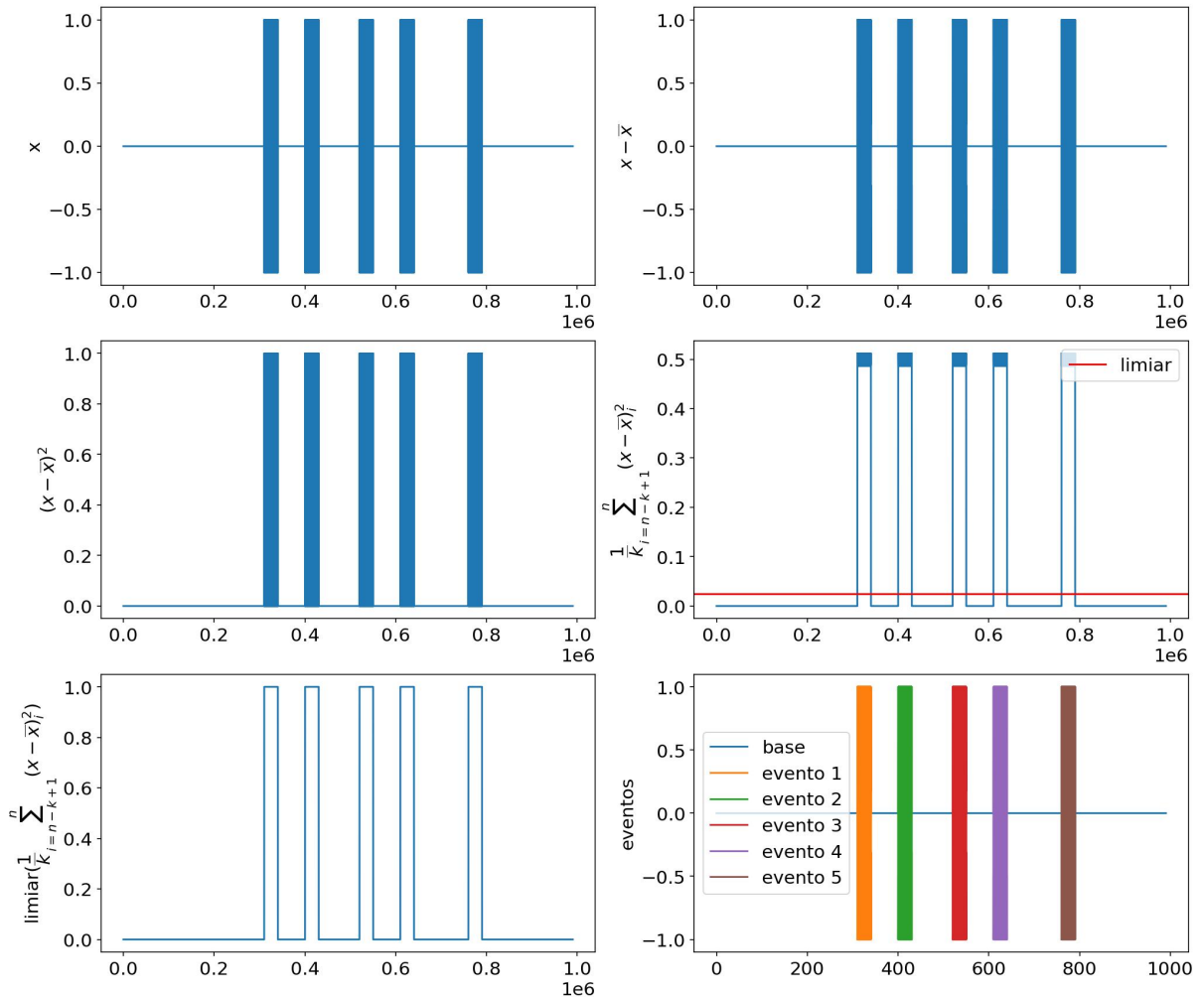


Figura 5 – Etapas para a identificação automática dos eventos sonoros a partir do sinal do estímulo sonoro utilizado. Em ordem, o sinal é subtraído de sua média, elevado ao quadrado para se tornar positivo. Um filtro média deslizante de 100 amostras é aplicado, e após isso, é feita a operação de limiar (*threshold*), resultando nos eventos sonoros.

Após a identificação dos mesmos, uma função é responsável pela seleção dos dados de um evento, com a possibilidade de inserir amostras antes e depois do evento, permitindo a visualização do regime transitório no início e fim do estímulo, bem como o regime estacionário.

3.8 Algoritmos para análise dos dados coletados

3.8.1 Transformada de Fourier Rápida (FFT)

A análise utilizando a transformada de Fourier foi direta para os experimentos realizados, uma vez que o estímulo auditivo é um tom puro modulado por uma frequência única e conhecida, de 53,71 Hz. A transformada de Fourier do sinal, que é percebida pelo animal experimental, consiste apenas da frequência moduladora, e pode ser interpretada basicamente como um pulso na frequência de 53,71 Hz. Portanto, ao se medir o potencial eletrofisiológico, observa-se um potencial evocado relativo a ativação de IC, na frequência de modulação do tom senoidal puro.

A Transformada de Fourier utilizada é fornecida pelo pacote *Numpy*, da linguagem de programação *Python*. Foram criados *scripts* em *Python 3.11*, para realizar a computação e pré-processamento da Transformada de Fourier, de modo que seja possível a obtenção eficiente e otimizada, em termos computacionais, da Transformada de Fourier Discreta unilateral.

A FFT dos sinais do IC, com o estímulo auditivo ocorrendo são mostradas na Subseção 4.1.2.

Ao se medir o potencial elétrico nos substratos cerebrais, uma forma simples de se observar potencial evocado (ativação da estrutura cerebral) é através da componente de frequência de interesse, ou seja, a frequência de modulação do estímulo sonoro, que aparece de forma significativa. Também é possível observar não-linearidades, em caso de outras componentes de frequência apresentarem uma amplitude significativa no resultado da Transformada de Fourier. Porém, tipicamente, os sinais medidos são contaminados com ruído e muitas vezes é difícil identificar se uma componente de frequência é fruto de não-linearidade ou apenas se trata de uma parcela espúria contida no sinal de interesse.

Por se tratar de um algoritmo tão conhecido e amplamente utilizado, o mesmo não traz nenhuma novidade em termos de resultados, mas é utilizado como referência durante todas as etapas de análise, tanto para validação dos algoritmos quanto para averiguação da qualidade dos sinais coletados.

3.8.2 Agrupamento Médio de Fase - MPC

O MPC foi implementado em *Python* em um *Notebook Jupyter*, que recebe dois sinais, um relativo ao estímulo auditivo e outro do potencial no IC, resultando em um gráfico polar e o MPC ($0 \leq \text{MPC} \leq 1$). O gráfico consiste em vetores unitários, indicando a diferença de fase instantânea entre os sinais durante o experimento. Para melhor visualização, também é plotado no gráfico, um vetor destacado, cuja amplitude

é o MPC e a fase é a fase média. Os MPCs dos experimentos estudados são mostrados nas Subfiguras 10a a 10j, da Figura 10. A implementação fez uso do pacote *Numpy*, que permite a manipulação de números complexos e funções básicas, como exponenciais de forma vetorizada, tornando o algoritmo enxuto e eficiente. O cálculo da fase instantânea pode ser visto no Código 3.3, que é utilizado na implementação do MPC e pode ser observada no Código 3.4. O algoritmo foi feito em duas versões, uma direta, e a outra utilizando janela deslizante, de modo que o MPC é calculado por janela no lugar da fase instantânea, as fases médias são mostradas no gráfico e o MPC de janela deslizante é a média dos MPCs de cada janela.

Código 3.3 – Cálculo da fase utilizando a transformada de Hilbert com auxílio dos pacotes Numpy e Scipy.

```
phase_x = np.unwrap(np.angle(scipy.signal.hilbert(x)))
```

Código 3.4 – Cálculo do agrupamento médio de fase e fase média utilizando Numpy.

```
Z = np.mean(np.exp(1j*(phase_x - phase_y)))  
mean_phase_clustering = np.abs(Z)  
mean_phase = np.angle(Z)
```

3.8.3 Espectrograma

O espectrograma é a renderização gráfica da Transformada de Fourier de tempo curto (*Short-Time Fourier Transform* - STFT) em um gráfico tridimensional, cujos eixos são: tempo, frequência e amplitude. O espectrograma é gerado em Matlab, utilizando janelas deslizantes de 10,4 s, com *nFFT* de 65536 e sobreposição de 90% entre janelas. Os parâmetros foram ajustados em Lockmann et al. [2017] e foram apenas utilizados neste trabalho, por se tratar de uma técnica usada apenas para validação e comparação. Os espectrogramas são mostrados na Subseção 4.1.3.

3.8.4 Análise Espectral de Alta Ordem no Domínio do Tempo

A análise espectral de alta ordem no domínio do tempo é apresentada em [Lainscsek and Sejnowski, 2015] e a dedução das equações matemáticas é mostrada em [Furtado Boreli, 2018]. Por se tratar de um algoritmo exaustivo e escalável, implementa-se o mesmo de forma que o cálculo do quadrispectro no domínio do tempo também resulte no cálculo do espectro, bispectro, e trispectro, aproveitando o laço de varredura de frequências e fases e otimizando o uso de recursos computacionais. A implementação é feita em *Python3.11* em um repositório dedicado, que fornece um pacote que pode ser importado e usado em outros projetos [Anjos, 2023a].

O algoritmo consiste de dois laços aninhados, um para a frequência e outro para a fase, e para cada iteração, cálculos vetoriais são executados. Considerando os cálculos vetoriais como constantes ($\Theta(c)$), a complexidade do algoritmo é $\Theta(n^2)$ para cada espectro, ou seja, para cada um dos termos da forma $\max_{\phi} \langle S^n P \rangle$ da Equação 2.4 seriam necessários dois laços aninhados distintos. A implementação otimizou o uso dos laços e consiste de apenas dois laços principais para qualquer espectro de alta ordem, e além disso, a biblioteca de *threading* denominada *Pathos* [McKerns et al., 2012] é usada para computação paralela dos espectros, permitindo o uso máximo dos recursos computacionais disponíveis e reduzindo consideravelmente o tempo para a estimação do TDHOSA, uma vez que uma das desvantagens da técnica é o seu custo computacional elevado, que pode resultar em várias horas de processamento.

O Algoritmo 1 mostra a implementação em Python do TDHOSA para o caso do Quadrispectro, onde *signal* é o sinal de entrada a ser processado, *freqs* é o vetor de frequências parametrizado (início, fim e passo) e *phases* é o vetor de fases parametrizado (somente o passo, começando de 0 e terminando em 2π). O algoritmo retorna vetores de amplitude e fase para o espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro.

Algoritmo 1 TDQS - *Time Domain Quadrispectrum*

```

1:  $squared\_signal \leftarrow signal^2$ 
2:  $cubed\_signal \leftarrow signal^3$ 
3:  $tetra\_signal \leftarrow signal^4$ 
4: for  $i, f$  in enumerate(freqs) do
5:    $max\_spectrum \leftarrow max\_bispectrum \leftarrow -\infty$ 
6:    $max\_trispectrum \leftarrow max\_tetraspectrum \leftarrow -\infty$ 
7:    $max\_phi\_spectrum \leftarrow max\_phi\_bispectrum \leftarrow -1$ 
8:    $max\_phi\_trispectrum \leftarrow max\_phi\_tetraspectrum \leftarrow -1$ 
9:   for  $\phi$  in phases do
10:     $P \leftarrow \cos(2\pi \cdot f \cdot t + \phi)$ 
11:     $x \leftarrow signal \cdot P$ 
12:     $evaluated\_spectrum \leftarrow mean(x)$ 
13:    if  $evaluated\_spectrum > max\_spectrum$  then
14:       $max\_spectrum \leftarrow evaluated\_spectrum$ 
15:       $max\_phi\_spectrum \leftarrow \phi$ 
16:    end if
17:     $x \leftarrow squared\_signal \cdot P$ 
18:     $evaluated\_bispectrum \leftarrow mean(x)$ 
19:    if  $evaluated\_bispectrum > max\_bispectrum$  then
20:       $max\_bispectrum \leftarrow evaluated\_bispectrum$ 
21:       $max\_phi\_bispectrum \leftarrow \phi$ 
22:    end if
23:     $x \leftarrow cubed\_signal \cdot P$ 
24:     $evaluated\_trispectrum \leftarrow mean(x)$ 
25:    if  $evaluated\_trispectrum > max\_trispectrum$  then
26:       $max\_trispectrum \leftarrow evaluated\_trispectrum$ 
27:       $max\_phi\_trispectrum \leftarrow \phi$ 
28:    end if
29:     $x \leftarrow tetra\_signal \cdot P$ 
30:     $evaluated\_tetraspectrum \leftarrow mean(x)$ 
31:    if  $evaluated\_tetraspectrum > max\_tetraspectrum$  then
32:       $max\_tetraspectrum \leftarrow evaluated\_tetraspectrum$ 
33:       $max\_phi\_tetraspectrum \leftarrow \phi$ 
34:    end if
35:  end for
36:   $spectrum[i] \leftarrow max\_spectrum$ 
37:   $phase\_spectrum[i] \leftarrow max\_phi\_spectrum$ 
38:   $bispectrum[i] \leftarrow max\_spectrum \cdot max\_bispectrum$ 
39:   $phase\_bispectrum[i] \leftarrow max\_phi\_bispectrum$ 
40:   $trispectrum[i] \leftarrow max\_spectrum \cdot max\_bispectrum \cdot max\_trispectrum$ 
41:   $phase\_trispectrum[i] \leftarrow max\_phi\_trispectrum$ 
42:   $tetraspectrum[i] \leftarrow max\_spectrum \cdot max\_bispectrum \cdot max\_trispectrum$ 
43:   $tetraspectrum[i] \leftarrow tetraspectrum[i] \cdot max\_tetraspectrum$ 
44:   $phase\_tetraspectrum[i] \leftarrow max\_phi\_tetraspectrum$ 
45: end for

```

3.9 Modelagem Polinomial Não-Linear

Todos os algoritmos foram implementados em *Python3.11*, de acordo com as Equações 2.6, 2.7 e 2.8. O processo de determinação de estrutura, estimação de parâmetros e validação dos resultados segue a seguinte ordem:

1. seleção da estrutura geral do modelo (NARX neste caso);
2. determinação da lista de regressores candidatos, indicando grau máximo de não-linearidade polinomial e número máximo de atrasos para os termos auto-regressivos;
3. execução do Critério de Taxa de Redução de Erro (ERR), obtendo uma lista ordenada de regressores;
4. execução do algoritmo para obtenção do Critério de Informação de Akaike;
5. seleção do número de parâmetros analisando o resultado do Critério de Informação de Akaike;
6. estimação dos parâmetros do modelo utilizando algum algoritmo (neste caso, Mínimos Quadrados, para o modelo NARX);
7. simulação livre do modelo NARX obtido;
8. execução da TDHOSA sobre a saída da simulação livre do modelo;
9. análise da saída da simulação livre do modelo e dos espectros de alta ordem no domínio do tempo da saída do modelo.

Várias combinações de entrada/saída foram testadas, bem como a quantidade máxima de não-linearidades, atrasos e regressores, mas os resultados não trouxeram novidades relevantes para análise.

4 RESULTADOS

Os resultados são divididos em três seções, de acordo com as bases de dados analisadas e o modelo polinomial não-linear. Sendo assim, a Seção 4.1 objetivou reproduzir as mesmas técnicas de análise utilizadas em [Simões et al. \[2020\]](#) comparando com a TDHOSA. A Seção 4.2 apresenta a base de dados 2 explorada apenas com TDHOSA. A Seção 4.3 apresenta uma análise via modelos polinomiais não-lineares referente a base de dados de número 2.

4.1 Base de dados número 1 - Alterações plásticas no Colículo Inferior após condicionamento clássico ao medo

4.1.1 Introdução

Os sinais da base de dados publicada por [Simões et al. \[2020\]](#) são mostrados na Figura 6.

Os resultados de [Simões et al. \[2020\]](#) indicam que o protocolo de condicionamento ao medo promoveu alterações substanciais no sinal registrado no colículo inferior. Vale ressaltar que as técnicas foram reproduzidas no animal selecionado, mas testes estatísticos foram realizados apenas para os resultados obtidos com a TDHOSA. Os resultados são apresentados em subseções, através de uma análise qualitativa e exploratória, visando identificar os aspectos da dinâmica dos sinais coletados.

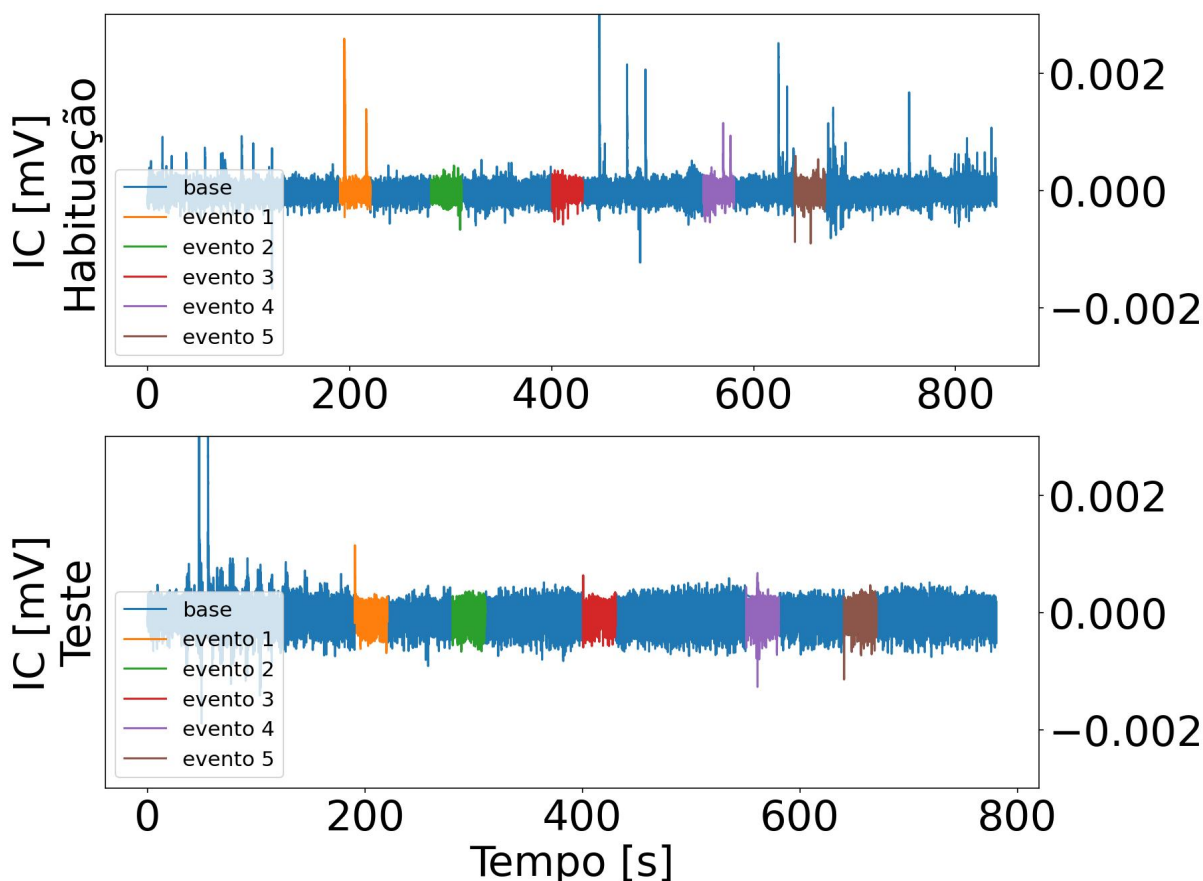


Figura 6 – O primeiro painel mostra o sinal coletado no IC durante a etapa de habituação, e o segundo painel mostra o sinal coletado no IC durante a etapa de teste. Os trechos em colorido indicam a ocorrência de um estímulo auditivo condicionado.

4.1.2 Transformada de Fourier rápida - FFT

A Figura 7 mostra a transformada de Fourier na banda em torno da frequência de interesse (53,71 Hz), para as fases de habituação e teste.

Para fase de habituação, a FFT possui ganhos levemente maiores na frequência de interesse, se comparado com as frequências ao redor, uma vez que no contexto biológico, o estímulo sonoro não possui relevância emocional, caracterizado como estímulo neutro.

Para a fase de teste, percebe-se um aumento considerável nessa proporção entre frequência de interesse e frequências vizinhas, além de um aumento de energia se comparado com o fase de habituação, o que foi esperado de acordo com os dados utilizados e literatura já publicada, uma vez que a rede neural se altera após o condicionamento e um número maior de neurônios passa a ser recrutado [Lockmann et al., 2017].

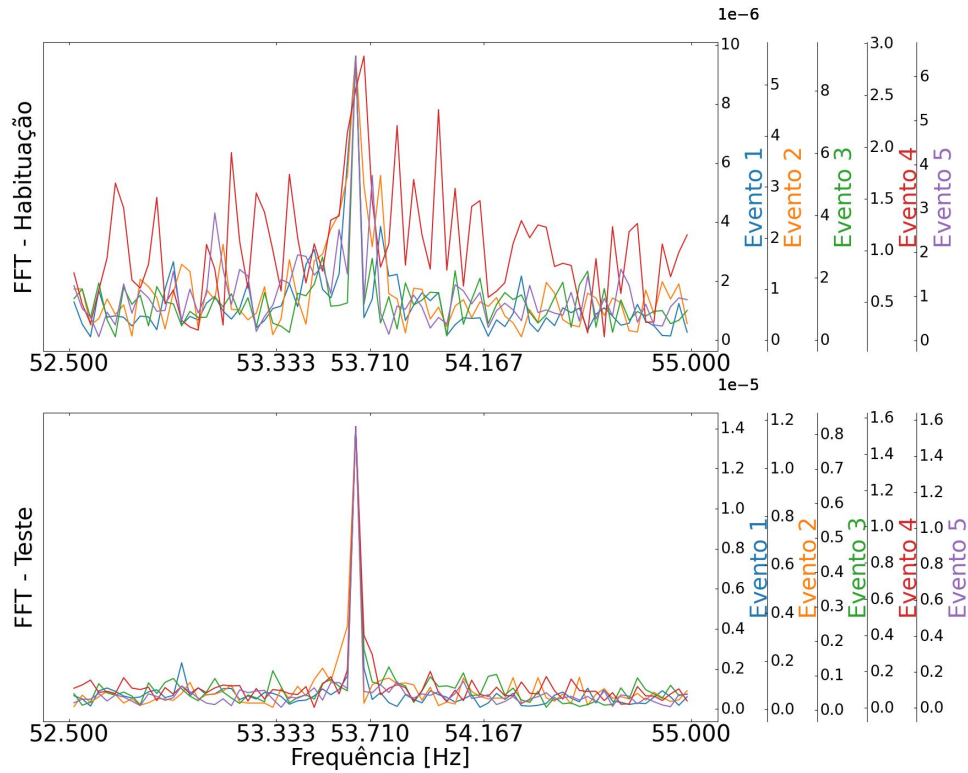


Figura 7 – FFT do IC durante os eventos sonoros dos experimentos de habituação e teste.

4.1.3 Espectrograma

A Figura 8 mostra o espectrograma da fase de habituação completo, enquanto a Figura 9 apresenta o mesmo, para a fase de teste.

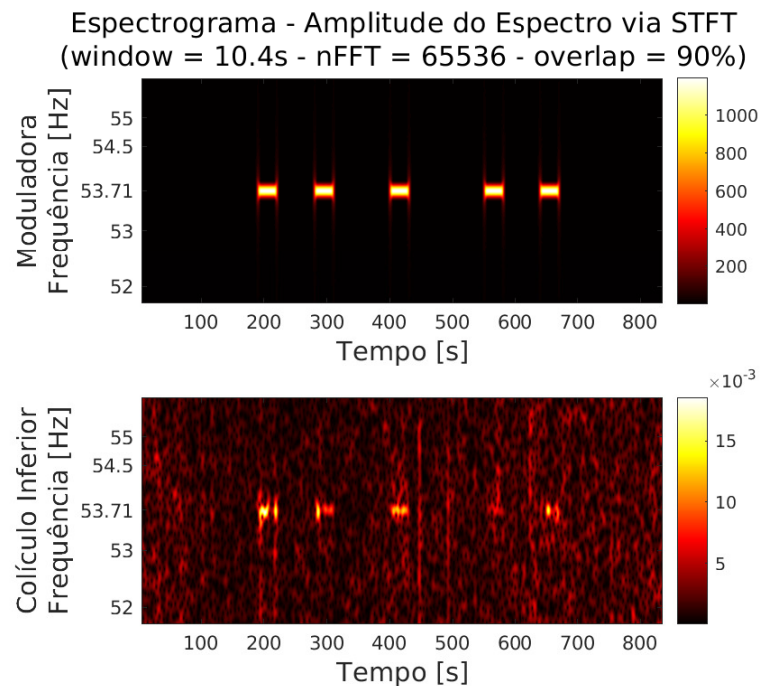


Figura 8 – Espectrograma para o experimento completo de habituação.

Assim como a FFT, a energia da frequência de interesse para a fase de habituação é maior que as demais na faixa de interesse, mas essa diferença se torna consideravelmente maior, para a fase de teste. O espectrograma possibilita a visualização da distribuição de energia ao longo de todo o experimento, permitindo uma comparação entre os eventos sonoros e a energia dos potenciais evocados, em um único gráfico.

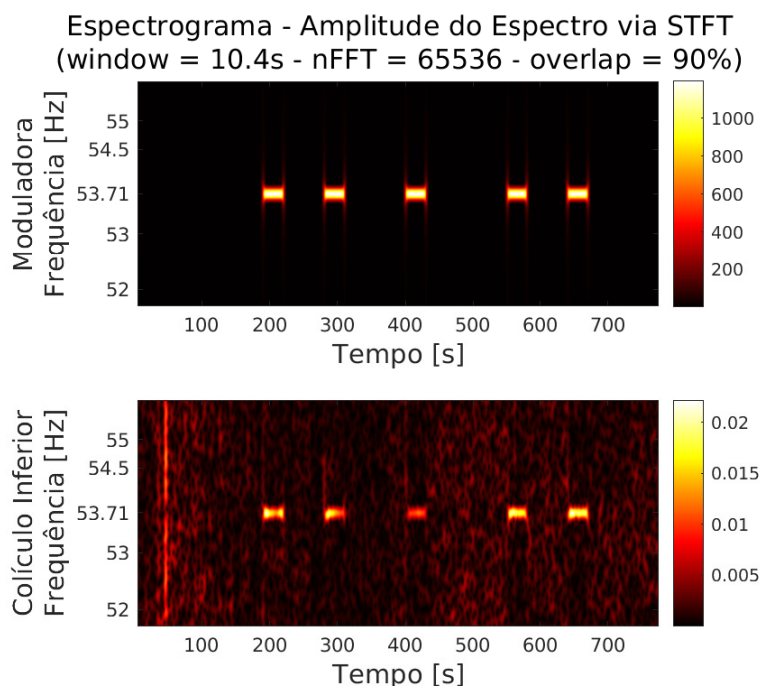


Figura 9 – Espectrograma para o experimento completo de teste.

4.1.4 Agrupamento Médio de Fase - MPC

O MPC é mostrado para as fase de habituação e teste, na Figura 10. A primeira linha (10a a 10e) mostra os eventos sonoros da habituação e a segunda linha (10f a 10j) mostra os eventos sonoros do teste.

Durante a etapa de habituação, percebe-se um baixo agrupamento de fase se comparado com a etapa de teste, que significa um baixo acoplamento ou sincronismo entre a onda sonora e o a resposta evocada. Na etapa de teste percebe-se um aumento significativo do sincronismo entre o estímulo sonoro e a resposta evocado no IC, ressaltando a relevância do estímulo e a plasticidade inerente a rede neural que fica mais eficaz em processa-lo. A magnitude do acoplamento pode ser percebido pela amplitude do vetor em destaque, que indica o MPC calculado, bem como a concentração das fases em torno do ângulo médio, o que é visualmente perceptível. Esse resultado indica que a razão entre a energia na frequência de interesse e as vizinhas aumentou, ou seja, a frequência de interesse passou a ser mais significativa no oscilador biológico. O MPC funciona bem para cenário onde existe um aumento significativo, porém, para casos onde esse aumento é pequeno,

essa técnica pode se tornar pouco assertiva, uma vez que não é trivial diferenciar pequenas diferenças relevantes daquelas calculadas por fatores indesejados do experimento. Contudo, essa técnica de análise possui um significado físico mais próximo do que se observa, que é a identificação da modulação da envoltória do estímulo sonoro no IC, causada pelo estímulo sonoro.

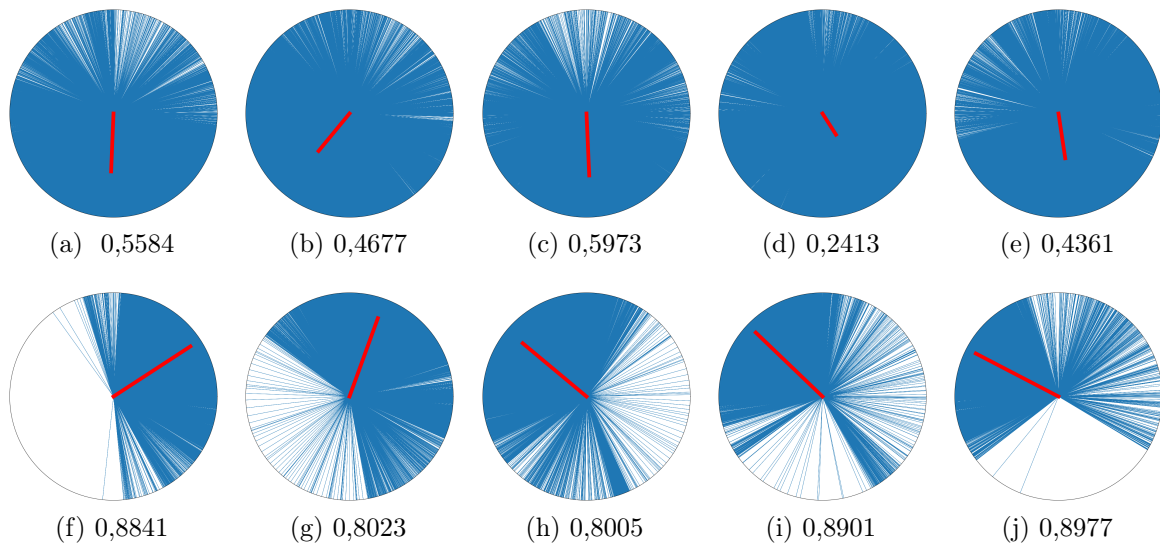


Figura 10 – MPCs de dois experimentos. A primeira linha, de (a) a (e), consiste nos 5 eventos sonoros de ambientação. A segunda linha, de (f) a (j), são os MPCs dos 5 eventos de teste, respectivamente.

4.1.5 Análise Espectral de Alta Ordem no Domínio do Tempo - TDHOSA

O espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro para as fases de habituação e teste, em torno da frequência da moduladora do estímulo sonoro, são mostrados nas Figura 11 e Figura 12, respectivamente.

Para a fase de habituação (Figura 11), no espectro, é possível ver uma amplitude maior para a frequência de interesse em comparação com as amplitudes das frequências vizinhas, porém, essa diferença é menor do que a obtida na fase de teste, e isso se torna mais evidente para os espectros de alta ordem, indicando que não há acoplamentos relevantes envolvendo a frequência da moduladora, para graus acima de 2.

Para a fase de teste (Figura 12), existe uma clara distinção na amplitude entre a frequência de interesse e as frequências vizinhas. Além disso, a informação não aparece de forma clara somente no espectro, mas também nos demais espectros de alta ordem, indicando que existem acoplamentos significativos de segunda, terceira e quarta ordem entre a frequência de interesse e demais frequências harmônicas. Em linhas gerais, a TDHOSA informa sobre a presença de informações não-lineares relevantes, indicando que é preciso de um modelo não-linear para modelar matematicamente de forma correta a

dinâmica do processo de consolidação de memória de medo.

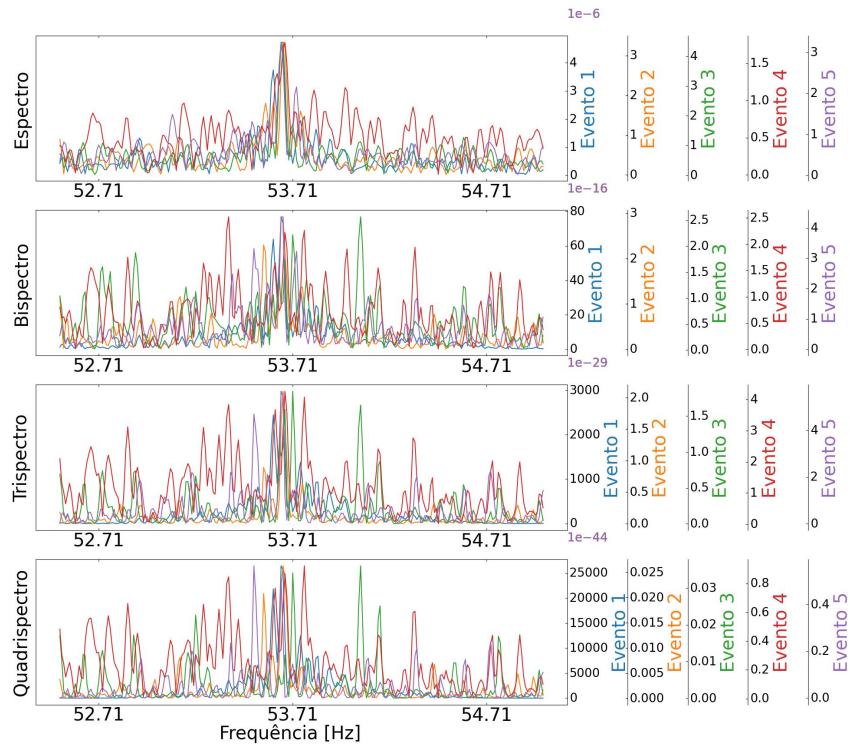


Figura 11 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro no domínio do tempo para os 5 eventos de habituação.

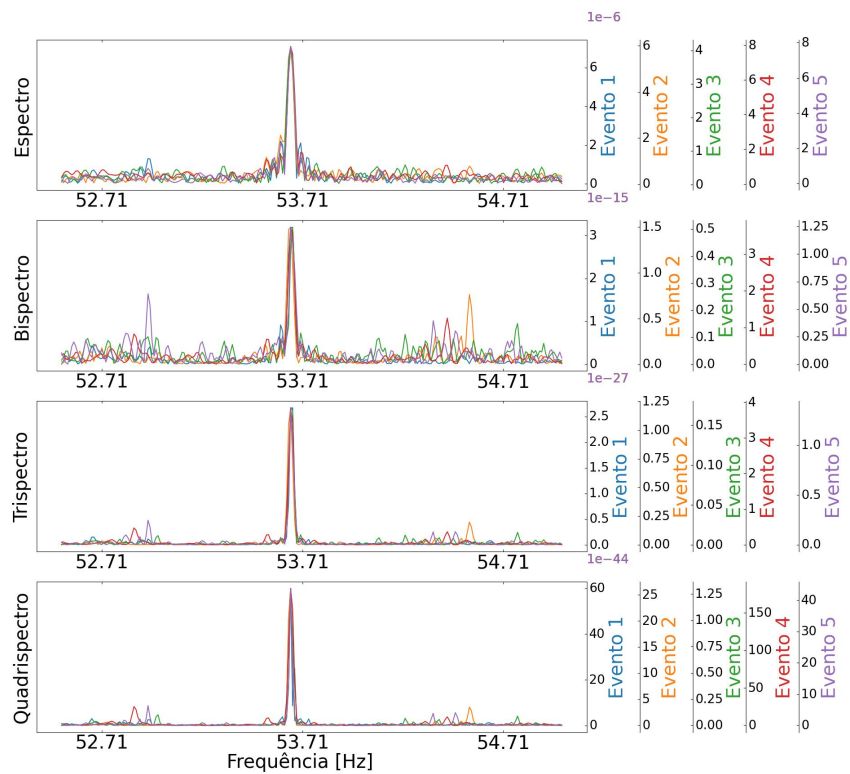


Figura 12 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro no domínio do tempo para os 5 eventos de teste.

Para cada um dos espectros, foram realizados testes-t comparando as etapas de habituação e teste, tendo como métrica a razão entre a amplitude na frequência de interesse e a média das amplitudes das frequências vizinhas (entre 50 Hz e 60 Hz, excluindo o pico da frequência de interesse). Os p-valores foram: 0,004 para o espectro, 0,026 para o bispectro, 0,008 para o trispectro e 0,005 para o quadrispectro, ou seja, existem diferenças estatísticas significativas entre as fases de habituação e teste para todos os espectros (p-valor < 0,05).

4.1.6 Considerações

As técnicas de análise apresentadas em [Simões et al., 2020] foram reproduzidas com sucesso, apresentando resultados condizentes com os publicados. Os resultados obtidos com a análise espectral de alta ordem no domínio do tempo são congruentes com os demais, o que é comprovado com a rejeição da hipótese nula para os quatro espectros. A TDHOSA também gerou resultados com informações novas, a respeito de não-linearidade e acoplamentos de frequência, além de resultar em espectros com formas de onda com melhor relação sinal-ruído se comparado com a FFT. Nenhuma das técnicas se mostrou redundante ou ineficaz.

4.2 Base de dados número 2 - Análise via TDHOSA em vários substratos cerebrais

4.2.1 Introdução

Os dados utilizados nesta sessão não foram publicados e consistem de sinais coletados simultaneamente em diferentes substratos cerebrais. O protocolo experimental foi, em parte, semelhante ao realizado no experimento de Simões et al. [2020], utilizando no caso, camundongos C57/BL6J. Os sinais relativos a um canal, de cada estrutura registrada, são exibidos abaixo. Registros referentes a fase de habituação são mostrados na Figura 13 e da fase de teste na Figura 14.

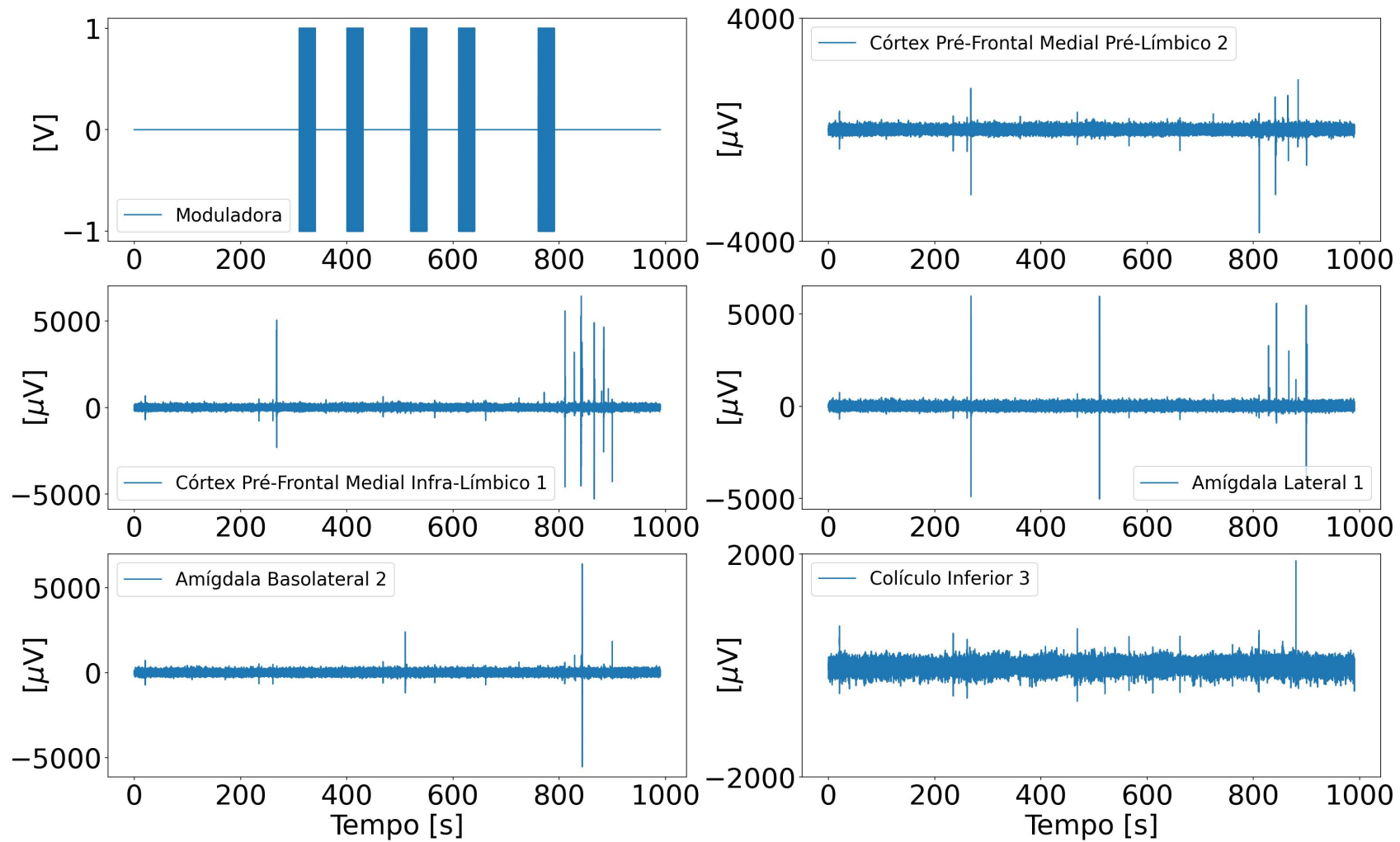


Figura 13 – Sinais nos substratos cerebrais durante a fase de habituação. O primeiro sinal se trata do estímulo condicionado, aplicado durante o AFC. Os demais sinais são os sinais registrados nos seguintes substratos: substratos infra-límbico e pré-límbico do córtex pré-frontal medial, amígdala lateral e basolateral e o colículo inferior, respectivamente. Apenas o canal com maior resposta evocada em cada substrato foi usado.

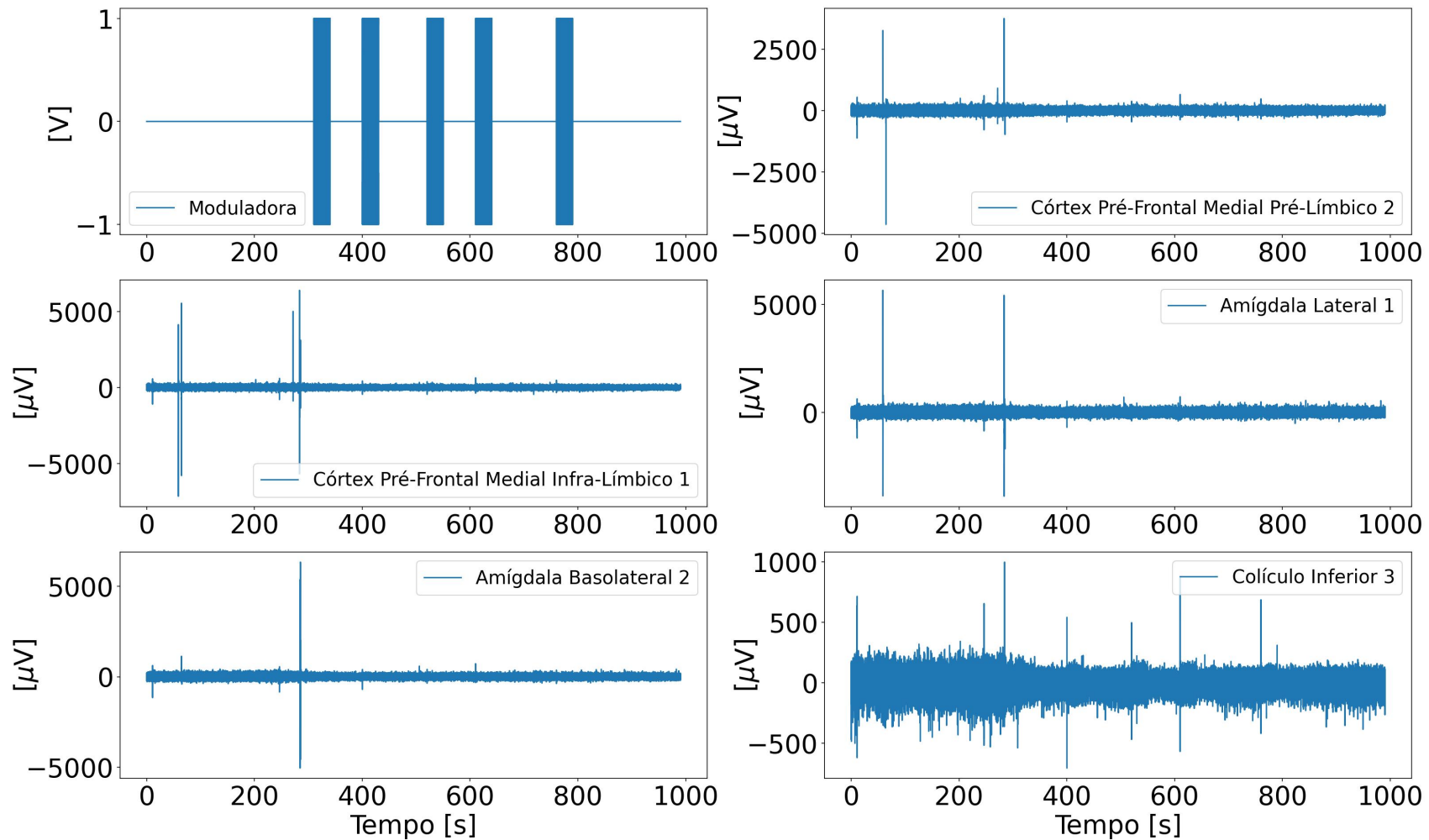


Figura 14 – Sinais nos substratos cerebrais durante a fase de teste. O primeiro sinal se trata do estímulo condicionado, aplicado durante o AFC. Os demais sinais são os sinais registrados nos seguintes substratos: substratos infra-límbico e pré-límbico do córtex pré-frontal medial, amígdala lateral e basolateral e o colículo inferior, respectivamente. Apenas o canal com maior resposta evocada em cada substrato foi usado.

Objetivou-se estudar a ativação simultânea e a relação entre as estruturas cerebrais durante o condicionamento ao medo auditivo. Duas análises foram feitas. A primeira análise segue na mesma linha realizada na Seção 4.1, porém, usando apenas a TDHOSA. A segunda análise é feita usando os dados da resposta condicionada de congelamento do sujeito experimental escolhido, também aplicando a TDHOSA nos três primeiros segundos do evento comportamental. Objetivou-se estudar a dinâmica neural por trás da resposta comportamental, sua relação com o estímulo auditivo e os substratos cerebrais recrutados.

4.2.2 Colículo Inferior

Nesta subseção são mostrados os espectros de alta ordem para o colículo inferior. De acordo com os dados, quatro diferentes canais (cada canal é um sinal coletado através de um eletrodo) foram implantados ao longo da estrutura neural. Para análise, foi escolhido o canal com a maior energia na resposta evocada em média, durante a etapa de teste, no caso o canal 3. A Tabela 2 mostra as amplitudes para cada um dos canais, para os 5 eventos sonoros durante fase de teste, e uma média entre os eventos. Vale ressaltar que a distribuição dos grupos celulares no colículo inferior obedece um mapa tonotópico, onde a região dorsal responde bem à baixas frequências e a região ventral à altas frequências. Sendo assim, de acordo com essa organização, a região mais central, referente ao canal 3, responde perfeitamente à frequência portadora utilizada de 10 kHz [Clopton and Winfield, 1973].

Amplitude no IC em 53,71 Hz		Canal do IC			
		1	2	3	4
Número do Evento	1	3,3320	18,1100	19,6700	16,8900
	2	6,1450	19,3300	21,6000	17,0000
	3	8,5930	22,2200	24,5000	19,2200
	4	6,5370	18,0900	19,1700	17,8000
	5	5,5750	13,0000	13,7000	14,8200
Amplitude Média em 53,71 Hz		6,0364	18,1500	19,7280	17,1460

Tabela 2 – Amplitudes dos 5 eventos sonoros durante a fase de teste para os 4 canais do IC e valor médio entre eventos sonoros. As linhas relativas ao *Número do Evento* possuem uma escala de cores branco-vermelho onde quanto mais vermelho, maior a amplitude. A linha *Amplitude Média em 53,71 Hz* possui uma escala de cores vermelho-branco-verde, onde a temperatura da cor está relacionada ao valor médio da amplitude da frequência moduladora dos 5 eventos sonoros, sendo vermelho o máximo, branco um valor intermediário e verde o mínimo.

Na Seção 4.1, a banda de frequências analisada foi em torno da frequência de modulação do estímulo sonoro, 53,71 Hz. Nesta Seção, a banda de frequência analisada é mais ampla, contemplado frequências entre 4 e 60 Hz.

A Figura 15 ilustra a TDHOSA do primeiro evento para a fase de habituação (15a) e teste (15b). O espectro no primeiro evento sonoro da fase de habituação apresentou, na frequência de modulação, 53,71 Hz, maior amplitude que os demais. Nos eventos seguintes, a amplitude reduziu. No IC, é possível observar uma maior energia na banda θ (4 a 12 Hz) na fase de teste, se comparado com a fase de habituação, no primeiro evento sonoro. Resultado largamente evidenciado pela literatura em diferentes substratos da via acústico límbica, principalmente no complexo amigdalóide e córtex pré-frontal. [Chen et al., 2021, Stujenske et al., 2014].

Em seguida, a Figura 16 mostra a TDHOSA do segundo evento para a etapa de habituação (16a) e teste (16b). Diferente do primeiro evento, o segundo evento sonoro apresentou amplitudes mais baixas, mas ainda sim com a fase de teste menos ruidosa, apresentando a frequência moduladora mais representativa. Isso é mais perceptível observando o bispectro, trispectro e quadrispectro da etapa de teste, em torno de 53,71 Hz. No espectro, a amplitude em 53,71 Hz é consideravelmente maior para teste, do que para a habituação, indicando maior energia nesta etapa. Apenas visualmente, já existem fortes evidências de alteração na dinâmica neural por meio do protocolo de AFC.

As TDHOSAs do terceiro evento sonoro são apresentadas na Figura 17, onde não se observa diferenças qualitativas comparado ao segundo evento. As TDHOSAs do quarto evento sonoro são mostradas na Figura 18 e as do quinto evento na Figura 19, onde em ambas, o espectro de cada apresenta uma maior distinção da frequência moduladora na etapa de teste.

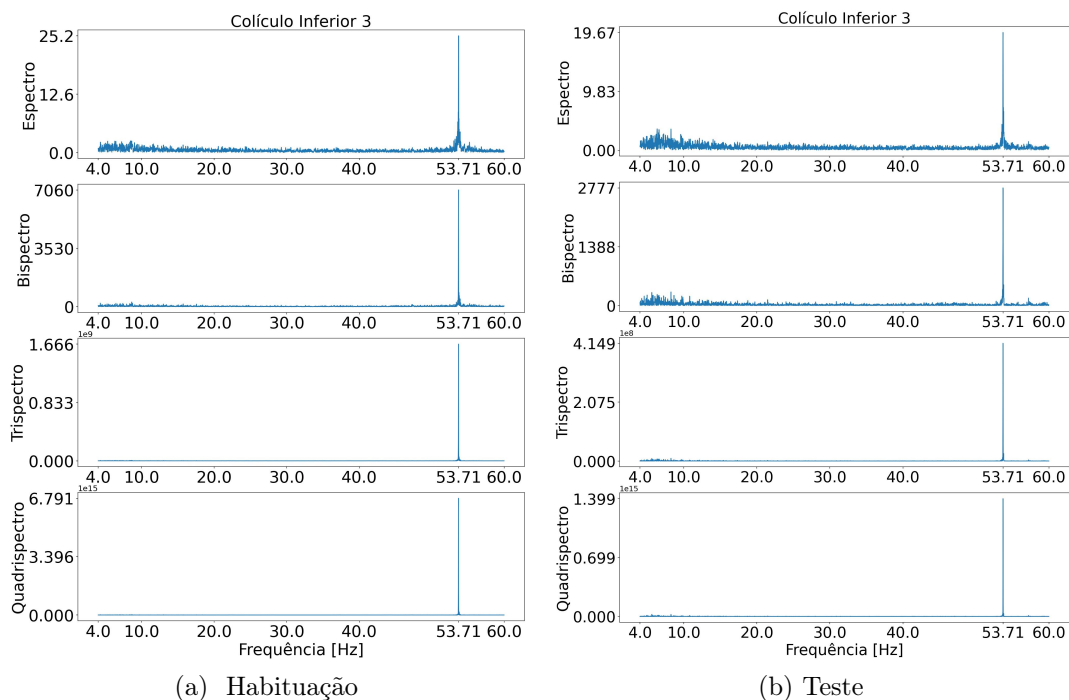


Figura 15 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para o evento 1, durante a habituação e o teste, respectivamente.

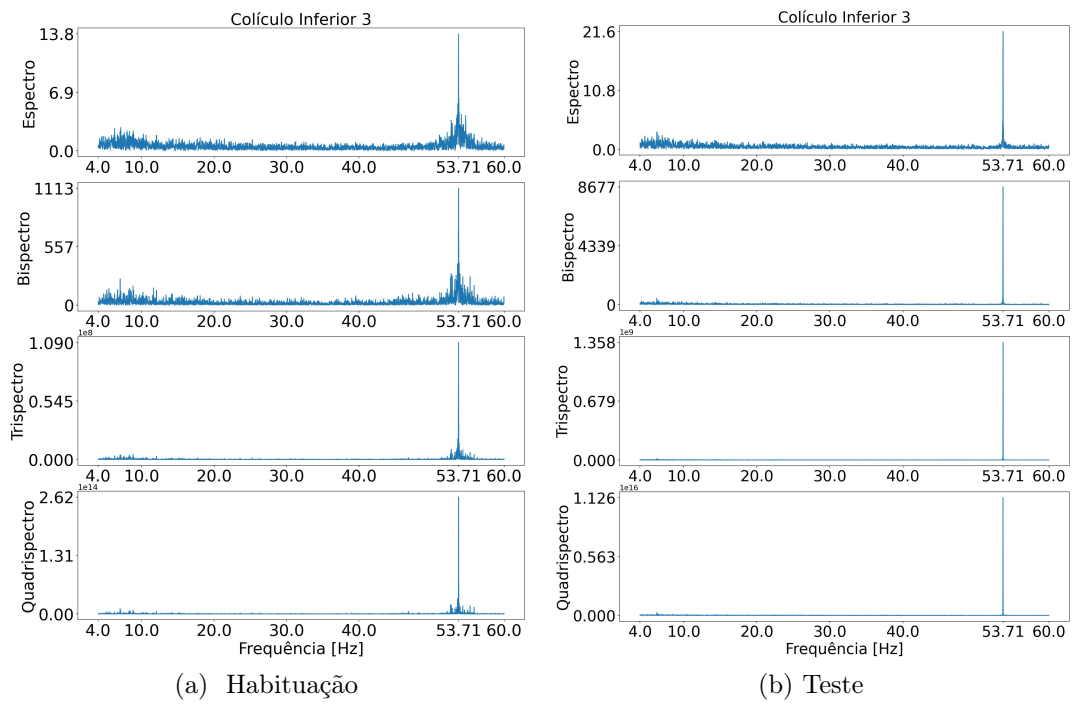


Figura 16 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para o evento 2, durante a habituação e o teste, respectivamente.

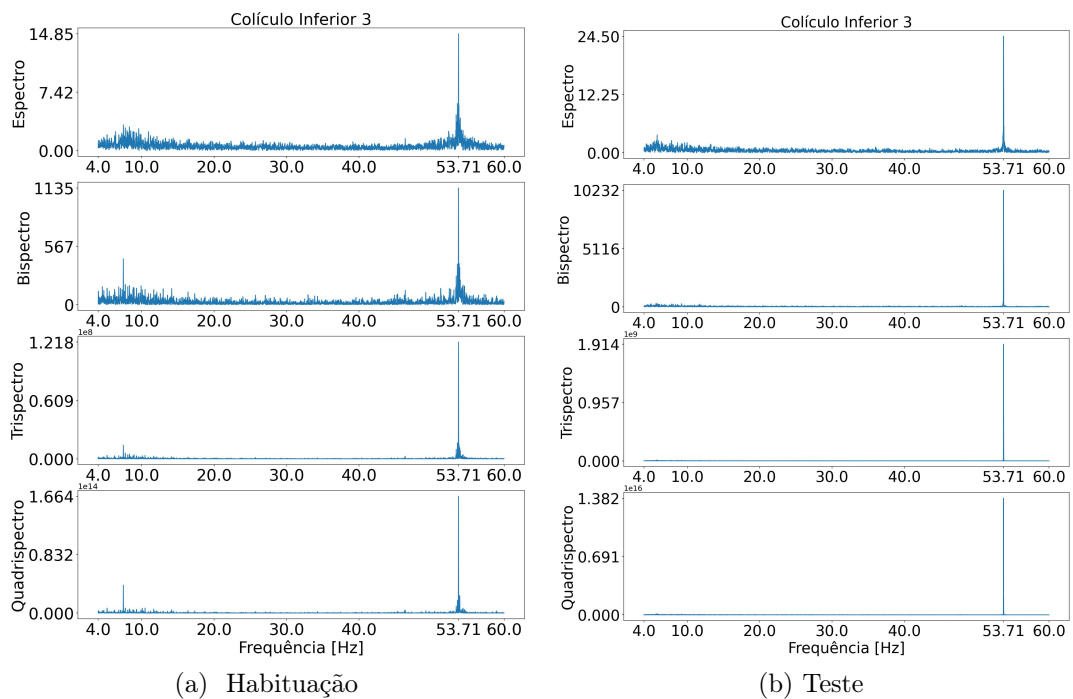


Figura 17 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para o evento 3, durante a habituação e o teste, respectivamente.

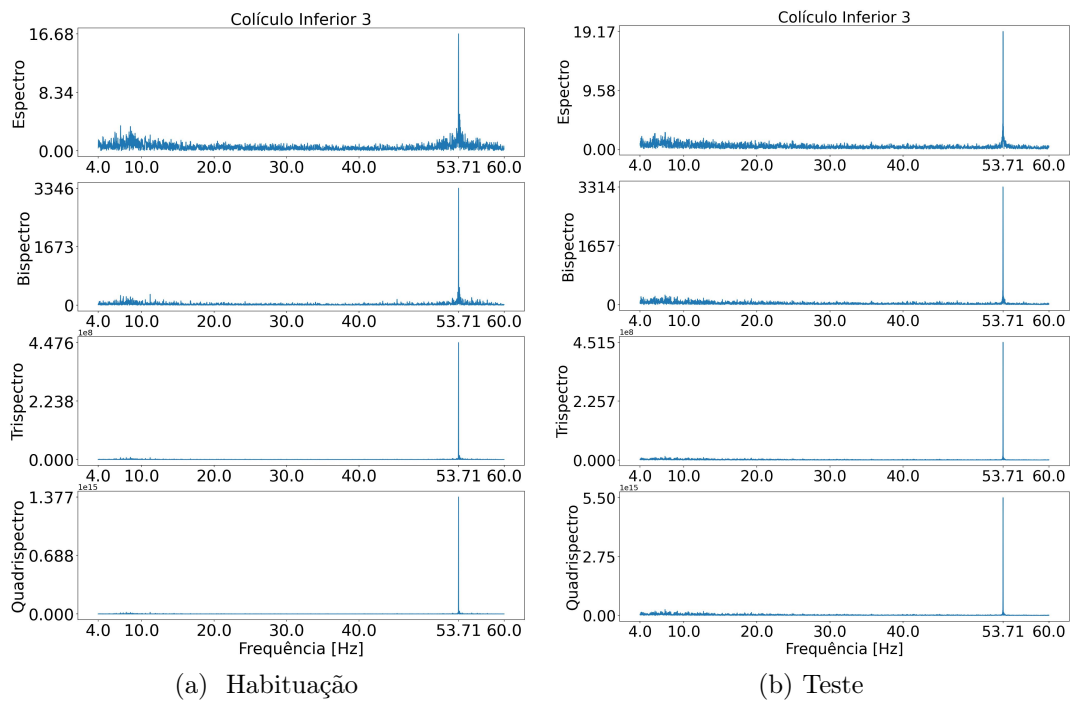


Figura 18 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para o evento 4, durante a habituação e o teste, respectivamente.

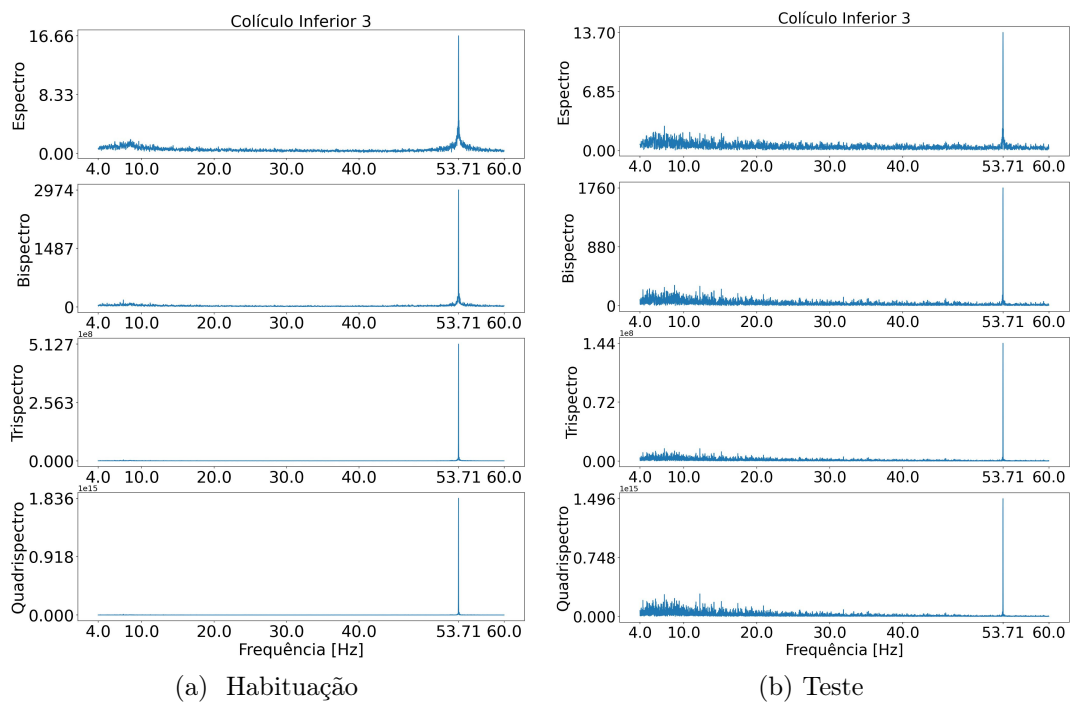


Figura 19 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para o evento 5, durante a habituação e o teste, respectivamente.

4.2.3 Amígdala Lateral

A amígdala lateral (AL) se comunica de maneira bidirecional com regiões do cérebro que processam cognição, motivação e resposta ao estresse [Sharp, 2017]. Para analisar os sinais da amígdala lateral, foram utilizados apenas dois eventos sonoros. Observando a Tabela 2, os eventos 3 e 2 apresentaram os maiores potenciais evocados no IC, durante a etapa de teste. Portanto, somente esses dois eventos são analisados nos demais substratos cerebrais.

A TDHOSA do sinal coletado na AL, durante o segundo evento sonoro da etapa de ambientação, é mostrado em 20a, bem como a TDHOSA correspondente para a etapa de teste, é apresentada em 20b, na Figura 20. Como esperado, na etapa de teste, há um aumento na concentração de energia em θ para todos os espectros se comparado com a etapa de habituação. Isso pode ser observado através do aumento de amplitude na banda θ , entre 4 e 8Hz, como já mostrado em [Chen et al., 2021]. A Figura 21 mostra os espectros da Figura 20 ampliados entre 4 e 15 Hz. Para o segundo evento sonoro, do ponto de vista da dinâmica do sinal, nenhuma diferença pode ser evidenciada visualmente na banda θ . A Figura 22 apresenta as mesmas informações da Figura 20, porém numa banda de frequência menor, entre 50 a 60 Hz, permitindo uma melhor visualização para análise em torno da frequência de interesse, a moduladora do som. Em ambas figuras, é possível perceber que existe um pico local em 53,71 Hz, pelo menos no espectro. Relacionando tal informação com os picos não-lineares observado no IC (que aparecem nos espectros de alta ordem), isso significa que os eventos sonoros que resultaram nas respostas evocadas com maior intensidade no IC não somente ativaram o mesmo, mas houve uma ativação simultânea da AL, mesmo que de forma consideravelmente menor do que a ativação do IC.

Observando a Figura 22, é possível identificar picos em 53,71 Hz também no bispectro e no trispectro, embora menos relevantes que as frequências vizinhas se comparado com o espectro. No quadrispectro, não se percebe nenhuma informação nessa frequência. Isso mostra que a AL apresenta um grau de não-linearidade consideravelmente menor do que o IC, ou seja, não é possível afirmar que existe acoplamento de frequência entre a moduladora do som e harmônicas para esse substrato cerebral, porém é possível afirmar que essa estrutura apresenta uma modificação em sua dinâmica após a tarefa de condicionamento de medo auditivo, uma vez que a resposta evocada muda da ambientação para o teste, para a banda de frequência em torno da frequência da moduladora.

Para o terceiro evento sonoro, mostrado na Figura 23, as TDHOSAs apresentam o mesmo comportado discutido nas Figuras 20, 21 e 22, porém, com o pico em 53,71 Hz ainda mais acentuado. Observando a Figura 23, embora a energia concentre-se basicamente na banda de menores frequências, o pico em 53,71 Hz é aproximadamente metade valor máximo de espectro, para as frequências baixas. O aumento de energia entre 4 e 8Hz

também se acentua durante este evento sonoro, se comparado com o anterior.

Observando o *zoom* em 4 e 15 Hz da Figura 23, mostrado na Figura 24, é possível perceber que para a banda θ , entre 4 e 8 Hz, há um aumento na atividade, se comparado com a média na banda exibida pelo gráfico, em todos os espectros. A Figura 25, apresenta o *zoom* da Figura 23 na banda γ , em torno da frequência moduladora do som. Analisando o espectro, o pico em 53,71 Hz é aproximadamente três vezes maior do que o valor médio do espectro para as frequências próximas. Além disso, é possível observar picos nessa frequência para o bispectro e trispectro de maneira ainda mais clara do que foi visto na Figura 22.

Analisando os potenciais evocados na AL, é possível perceber que para esses dois eventos sonoros em específico, há um pico visível em 53,71 Hz, mesmo com grande parte da resposta sendo visível na banda θ .

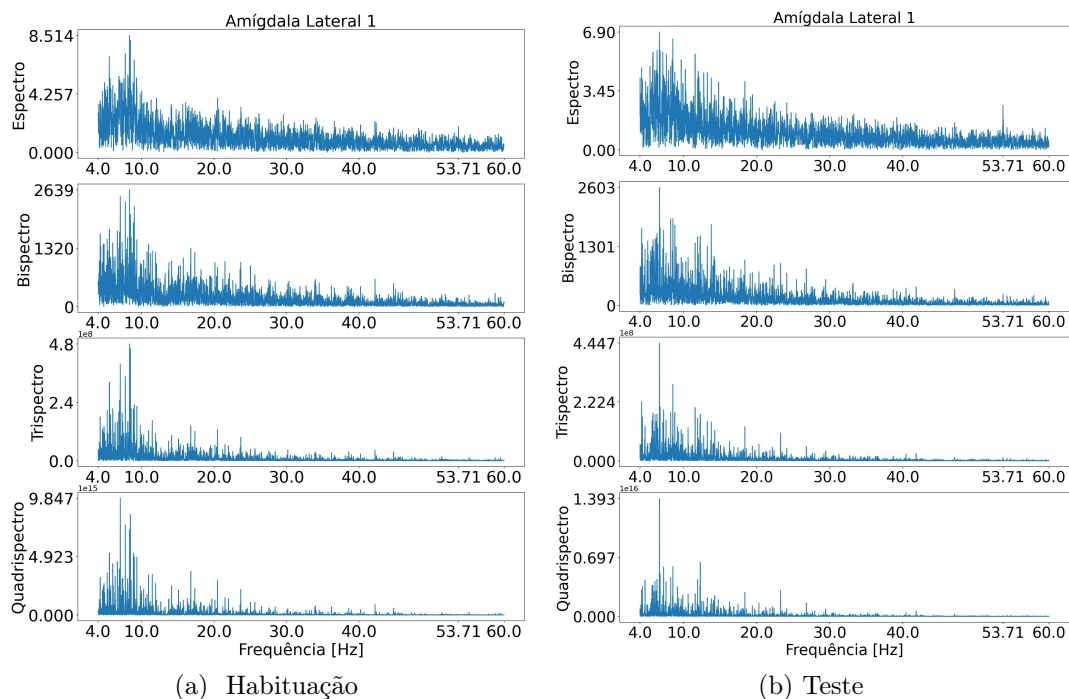


Figura 20 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrisspectro da AL no domínio do tempo para o evento 2, durante a habituação e o teste, respectivamente.

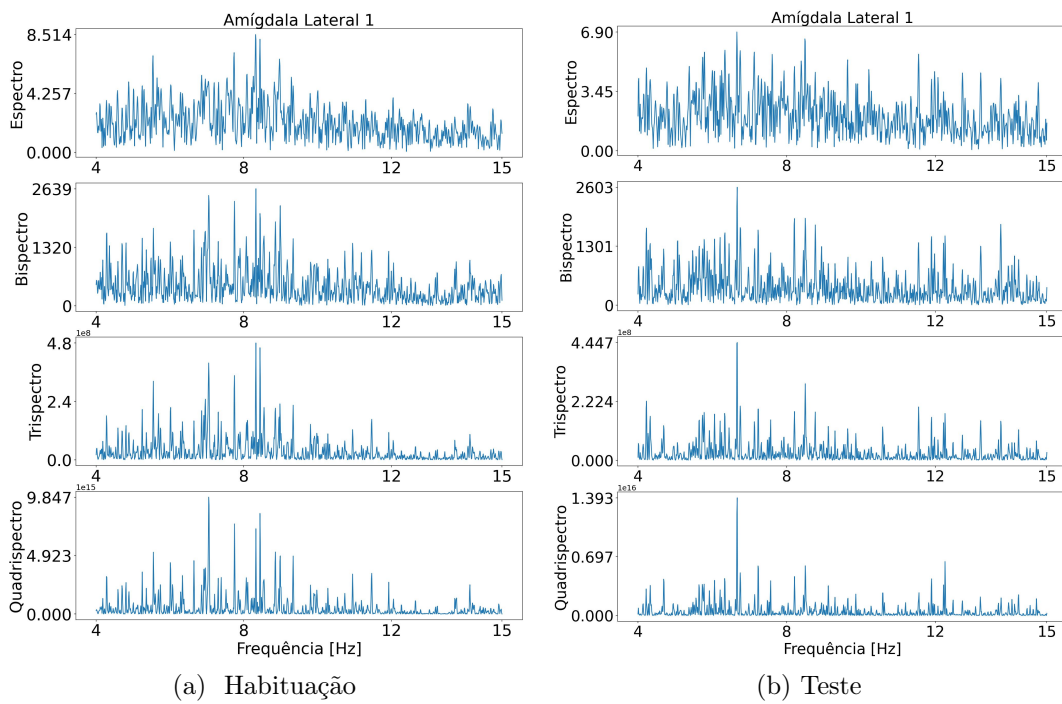


Figura 21 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 2, ampliados na faixa de frequências entre 4 a 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.

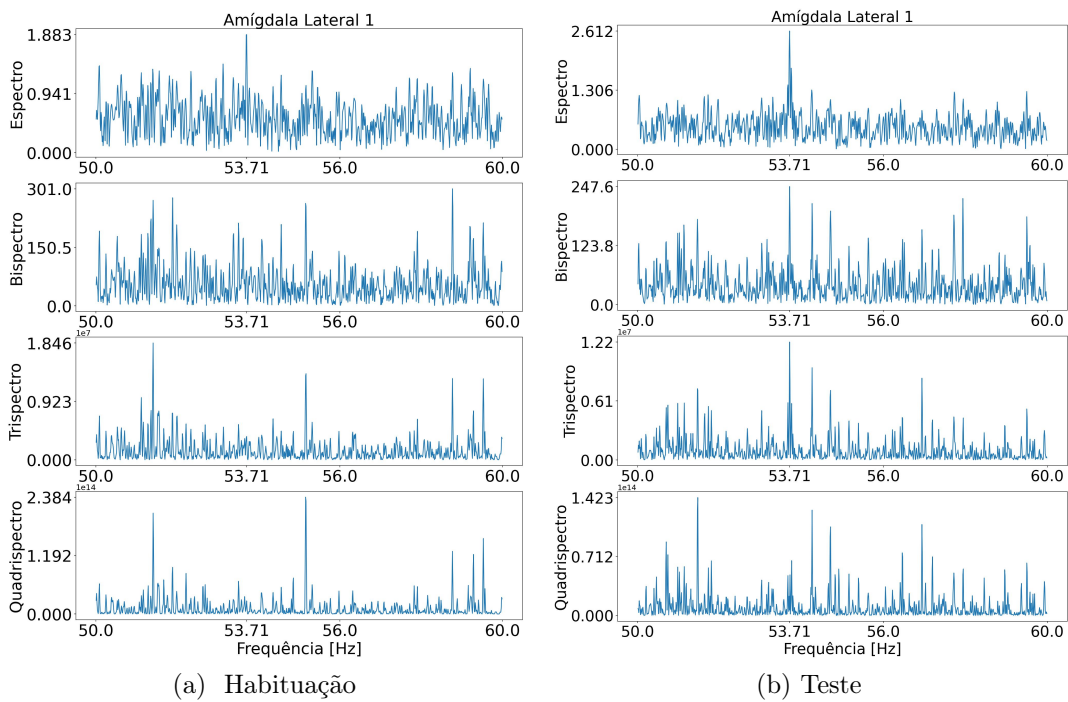


Figura 22 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 2, ampliados na faixa de frequências entre 50 a 60 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.

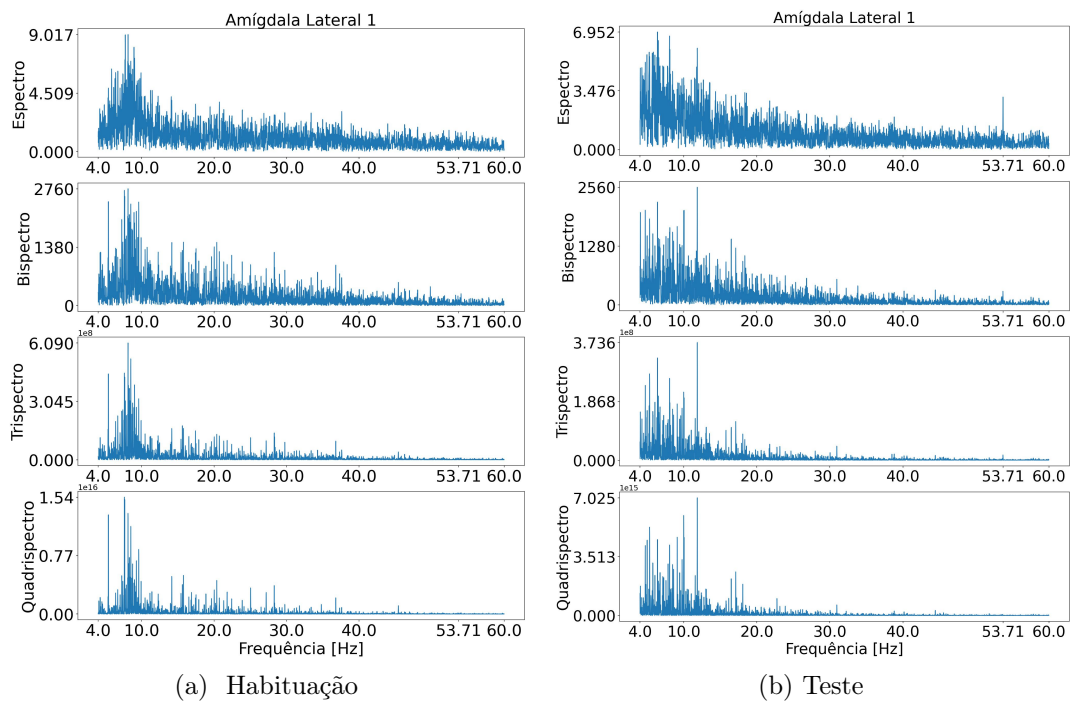


Figura 23 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 3, durante a habituação e o teste, respectivamente.

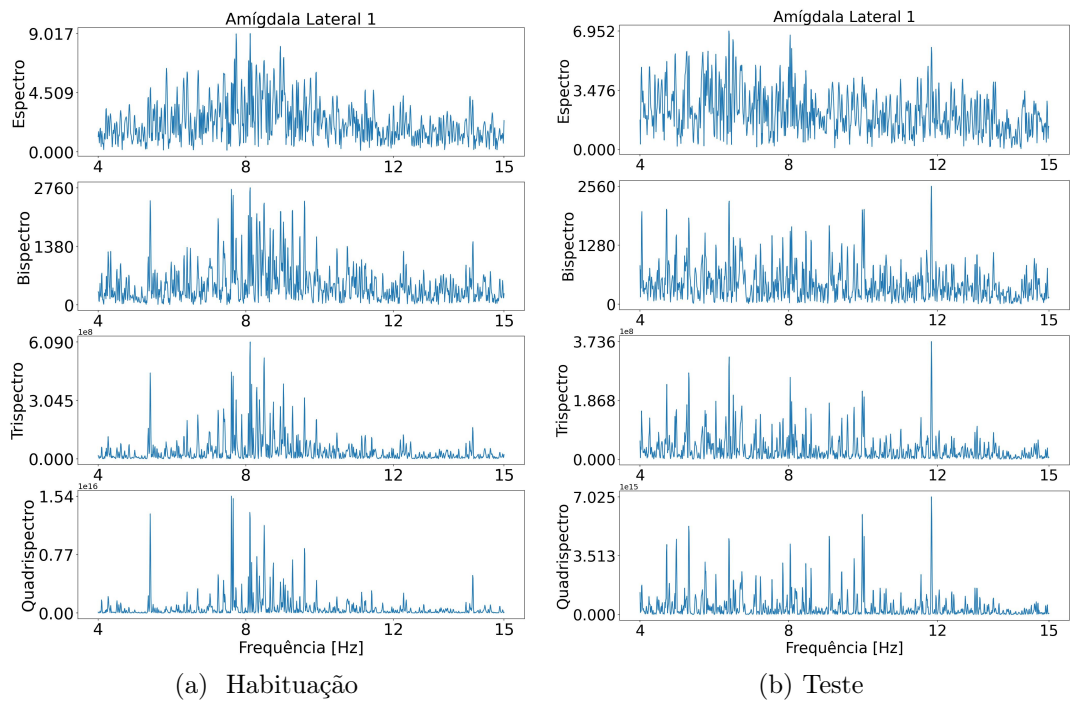


Figura 24 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 3, ampliados na faixa de frequências entre 4 a 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.

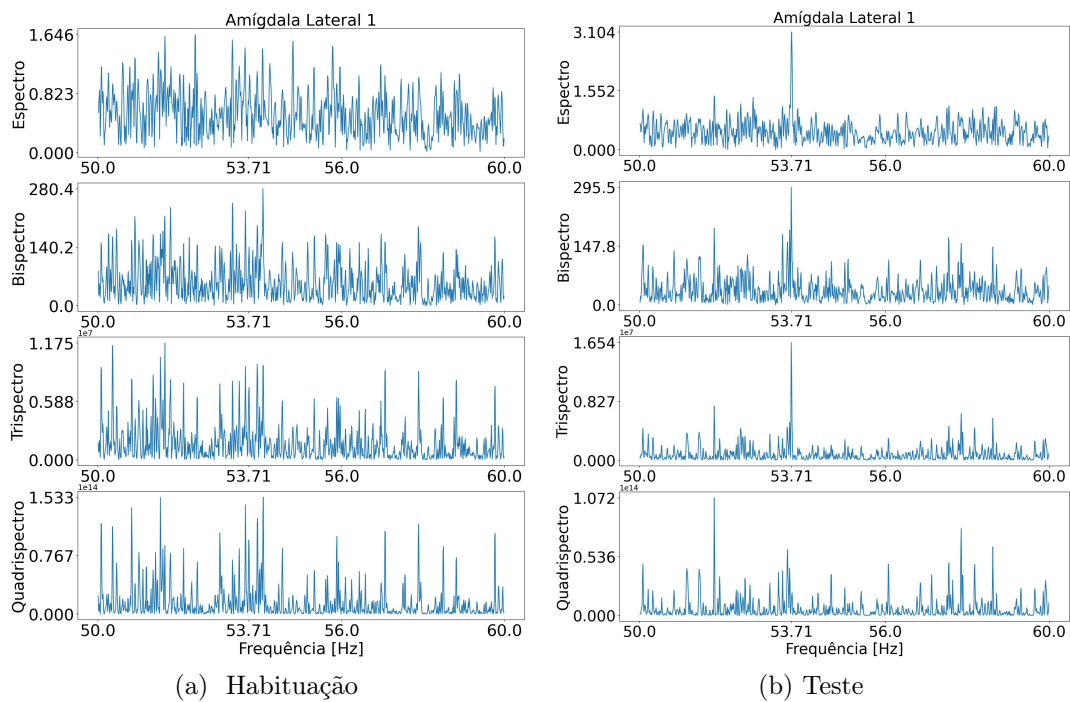


Figura 25 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da AL no domínio do tempo para o evento 3, ampliados na faixa de frequências entre 50 a 60 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.

4.2.4 Amígdala Basolateral

Assim como a AL, a amígdala basolateral (ABL) também atua no processamento da relevância dos estímulos sensoriais, sendo considerada um centro integrativo das aferências processadas na AL [Rogan and LeDoux, 1996].

A Figura 26 mostra os espectros do segundo evento sonoro na ABL, onde se vê um aumento de amplitude na banda θ entre as etapas de habituação e teste, indicando que a amígdala basolateral se assemelha com a amígdala lateral, possivelmente com sincronismo entre ambas. A Figura 27 mostra os espectros ampliados na banda θ , onde é possível perceber com uma melhor visualização esse aumento na banda θ , como também aconteceu na AL. Durante a etapa de teste, a Figura 26b apresenta um pico em 53,71 Hz, para todos os espectros, o que é mostrado com maior resolução na Figura 28b. Na Figura 28b, é possível identificar o pico somente até o trispectro, assim como foi observado na AL, o que indica a ausência de dinâmica de quarto grau relevante para a frequência analisada. Os espectros da ABL para o evento sonoro 3 são mostrados nas Figuras 29, 30 e 31, sendo a versão completa e as versões ampliadas, em θ e γ , respectivamente. A Figura 30 amplia os espectros da Figura 29 entre 4 e 15 Hz. Assim como foi no evento 2, é possível perceber um aumento na concentração de energia em θ , se comparar a quantidade de frequências com amplitude maior do que a metade do pico na banda. O comportamento dinâmico para o evento 3 é o mesmo comportamento apresentado no evento 2, com exceção do

quadrisspectro na etapa de teste (quarto painel da Figura 31b), que apresenta também um pico distinguível visualmente em 53,71 Hz. Para o IC (Figura 17), AL (Figura 23) e ABL (Figura 29), no terceiro evento houveram os maiores picos em 53,71 Hz, bem como um aumento de energia entre as etapas de ambientação e teste, para a banda de 4 a 8Hz.

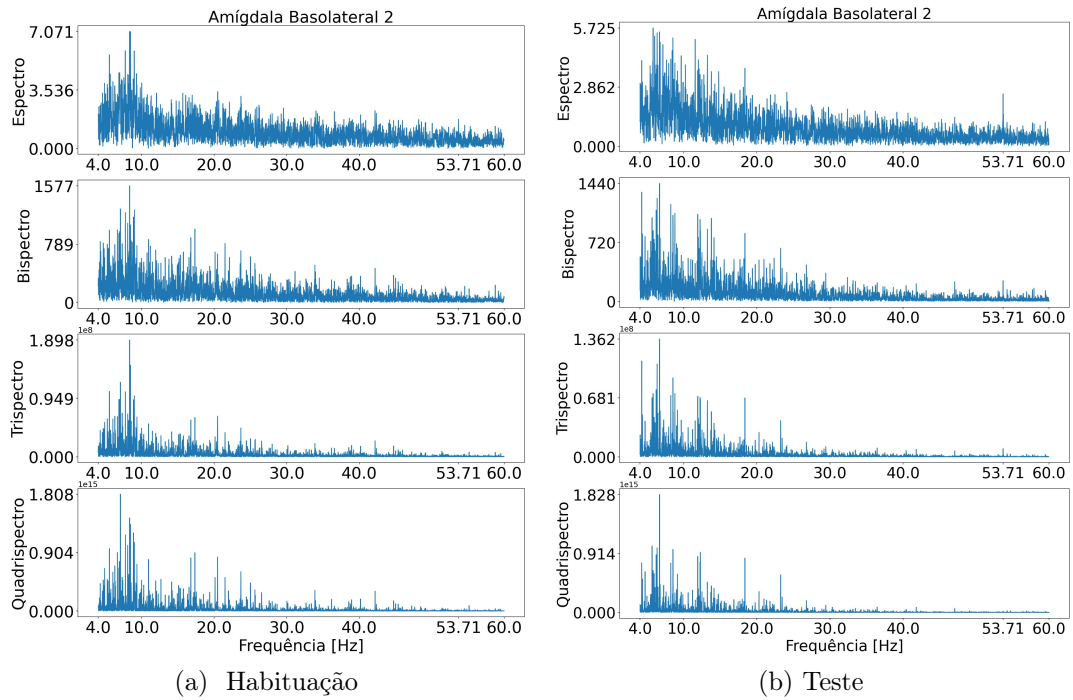


Figura 26 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrisspectro da ABL no domínio do tempo para o evento 2, durante a habituação e o teste, respectivamente.

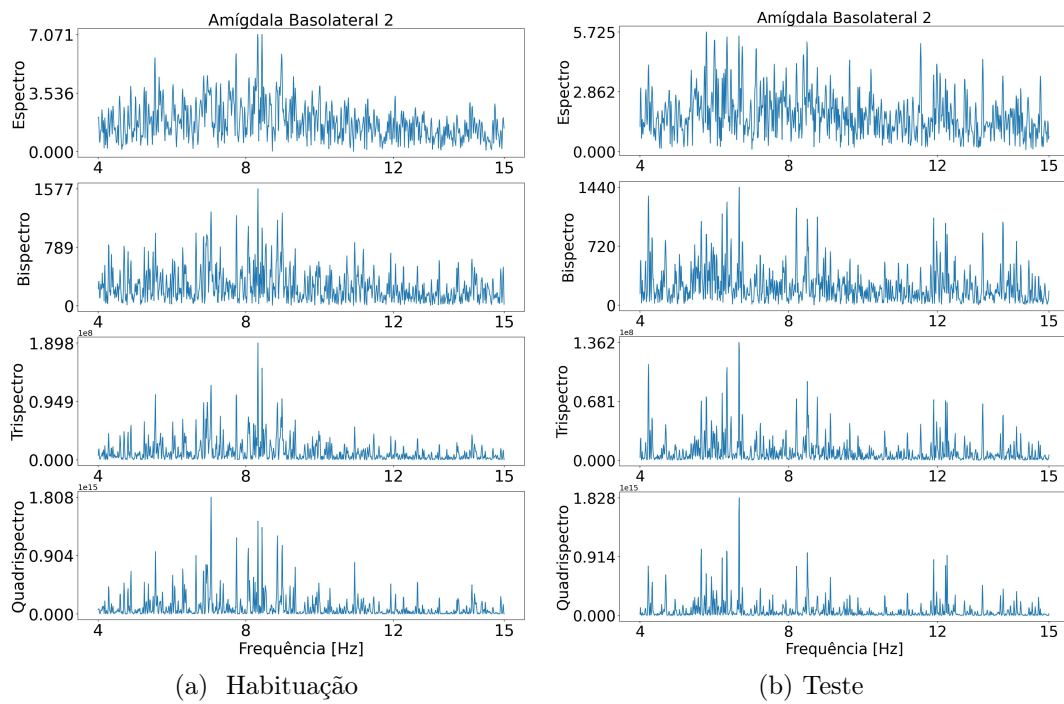


Figura 27 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 2, ampliados na faixa de frequências entre 4 a 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.

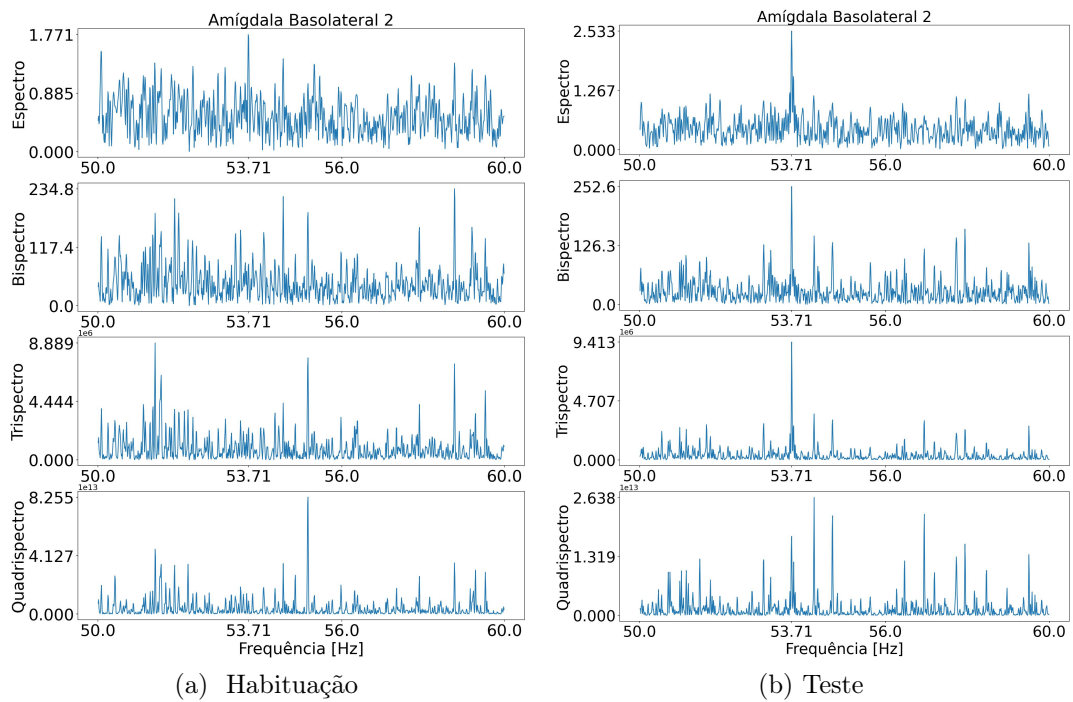


Figura 28 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 2, ampliados na faixa de frequências entre 50 a 60 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.

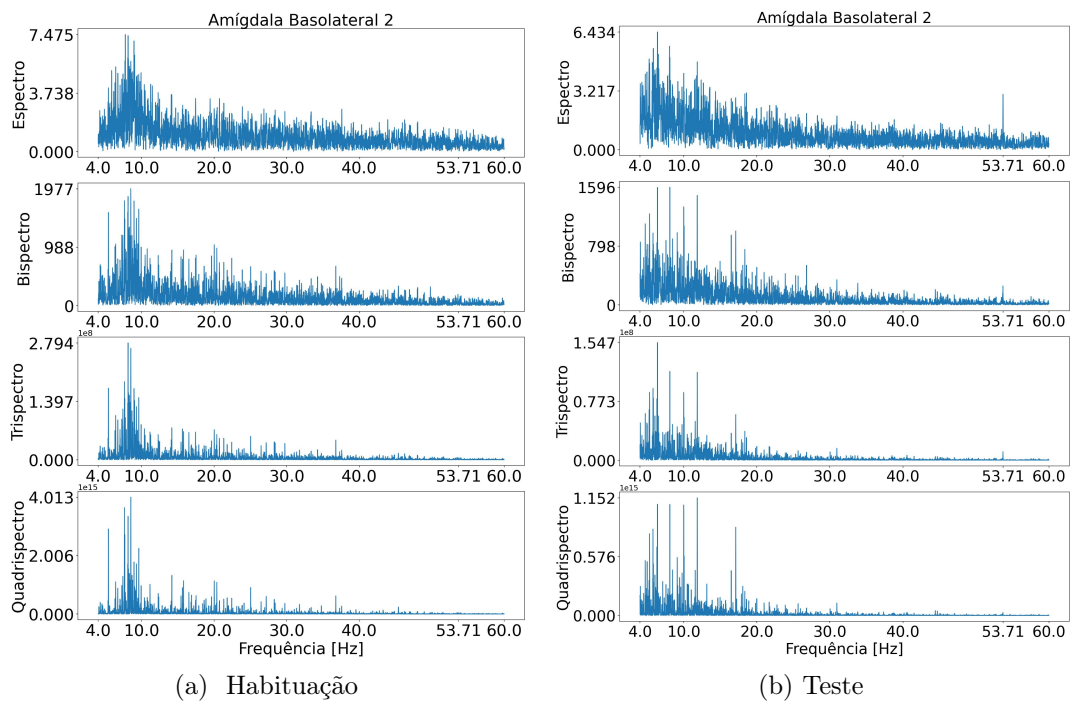


Figura 29 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 3, durante a habituação e o teste, respectivamente.

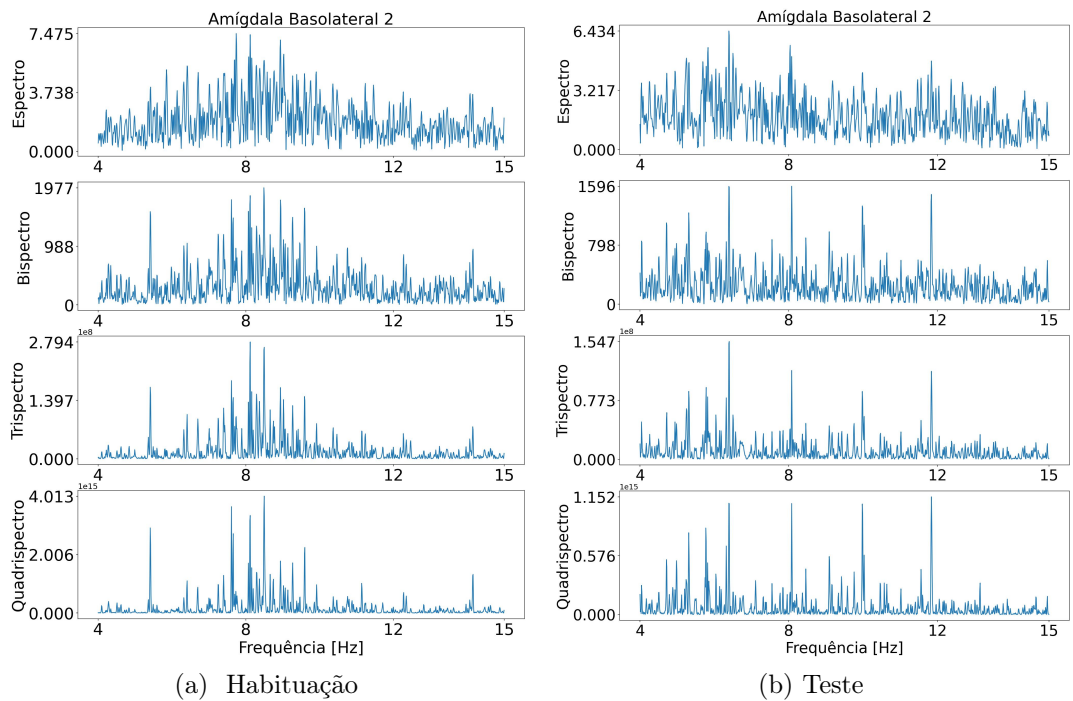


Figura 30 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 3, ampliados na faixa de frequências entre 4 a 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.

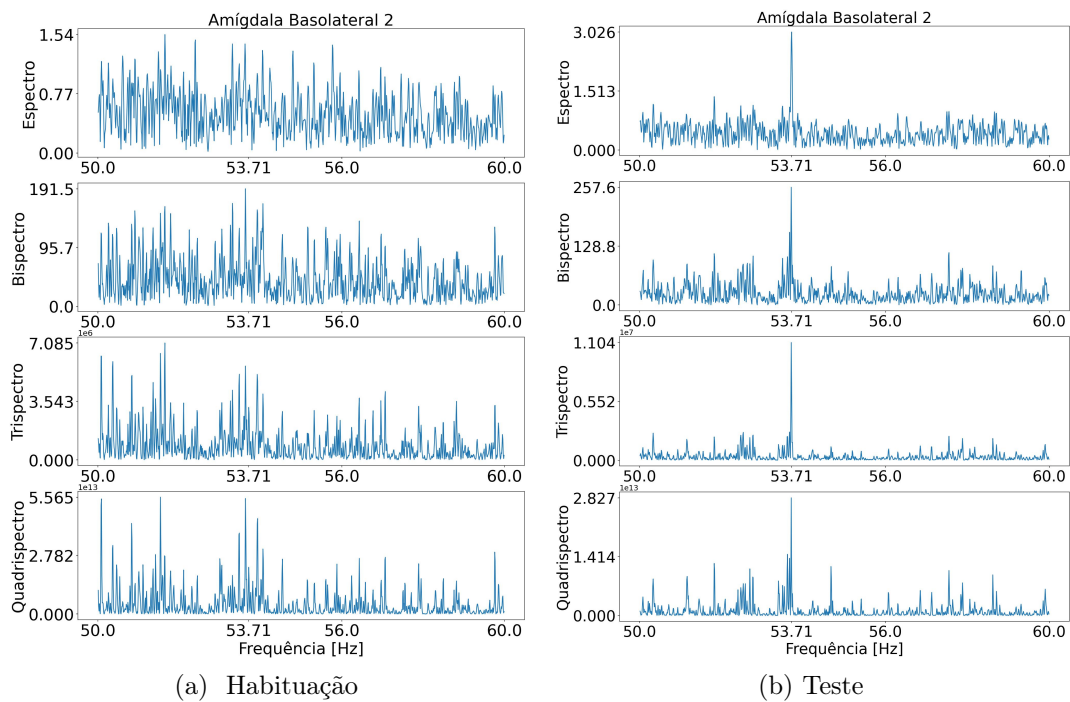


Figura 31 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro da ABL no domínio do tempo para o evento 3, ampliados na faixa de frequências entre 50 a 60 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.

4.2.5 Córtex Pré-Frontal Pré-Límbico

Além da AL e da ABL, o córtex pré-frontal pré-límbico também faz parte das estruturas que entram em sincronia e possuem aumento de energia na banda θ após o AFC [Chen et al., 2021], sendo o substrato com o aumento mais distinguível visualmente nesta banda, dentre os três. Além disso, o mesmo também se sincroniza com o estímulo sonoro, de maneira fraca, mas o suficiente para se observar um pico em 53,71 Hz.

A Figura 32 apresenta a TDHOSA do córtex pré-frontal pré-límbico durante o segundo evento sonoro, na banda completa de inspeção, entre 4 e 60 Hz. As Figuras 33 e 34 apresentam as versões ampliadas nas faixas de 4 a 15 Hz e 50 a 60 Hz, respectivamente. A TDHOSA na etapa de habituação (Figura 33a) apresenta energia dispersa entre as frequências mostradas, já na etapa de teste (Figura 33b), existe uma concentração da energia em aproximadamente 6Hz, além de uma pequena concentração em aproximadamente 11Hz. Essa mudança indica que o córtex pré-frontal pré-límbico também sofre alterações dinâmicas durante o protocolo de AFC. Já a Figura 34 apresenta a TDHOSA na banda γ , focado em torno da frequência moduladora. Assim como foi para a banda θ , durante a etapa de habituação (Figura 34a), a energia é dispersa entre as frequências mostradas, porém, na etapa de teste (Figura 34b), existe uma concentração da energia em 53,71 Hz, indicando que o córtex pré-frontal pré-límbico também se sincroniza com o estímulo sonoro percebido pelo animal, durante o protocolo de AFC. Durante o terceiro evento sonoro, na

Figura 35, os espectros de alta ordem são apresentados. Observando a banda completa dos espectros, é possível perceber um pico em θ na etapa de teste, que difere da etapa de habituação, que também mostra um pico, mas com um perfil mais disperso e com menor amplitude no espectro. A figura 36 apresenta os espectros da Figura 35, ampliados entre 4 e 15 Hz. Comparando os espectros da habituação com os espectros do teste, também é possível identificar uma evidenciação em ≈ 6 Hz na etapa de teste, além de um aumento de amplitude se comparado com a etapa de habituação, em todos os espectros mostrados. A Figura 37 apresenta os espectros da Figura 35, ampliados entre 50 e 60 Hz. Novamente, comparando os espectros da habituação com os espectros do teste, é possível identificar a presença de um pico na frequência da moduladora do estímulo sonoro, 53,71 Hz, somente na etapa de teste, em todos os espectros mostrados, também indicando sincronismo entre o estímulo sonoro e o córtex pré-frontal pré-límbico durante a etapa de teste, que não ocorria na etapa de habituação.

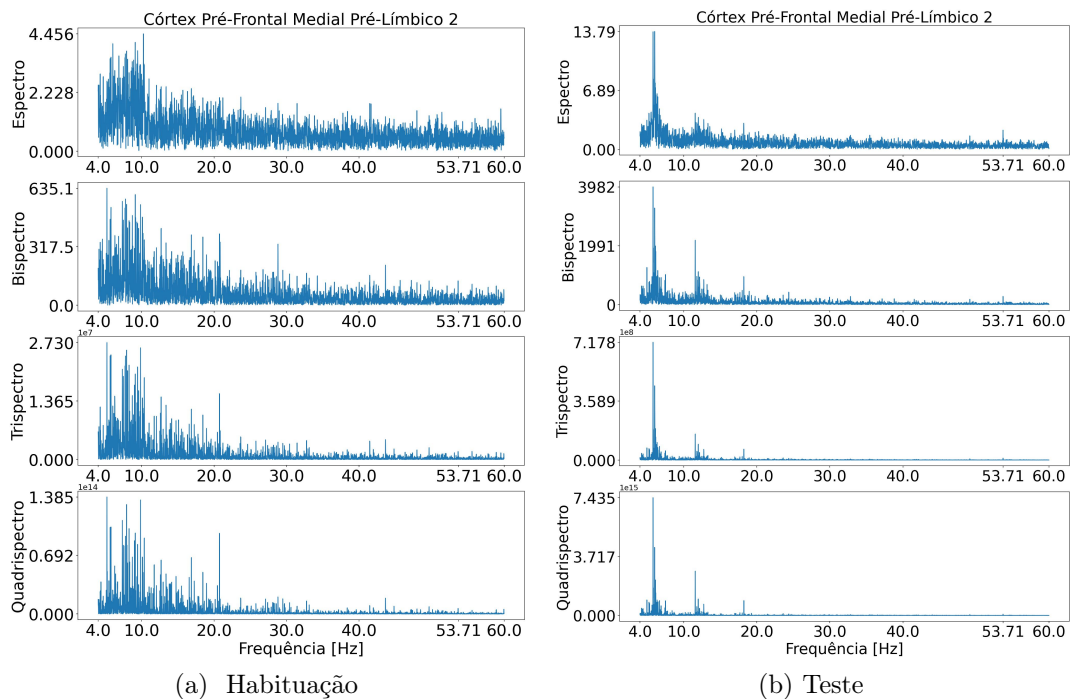


Figura 32 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 2, durante a habituação e o teste, respectivamente.

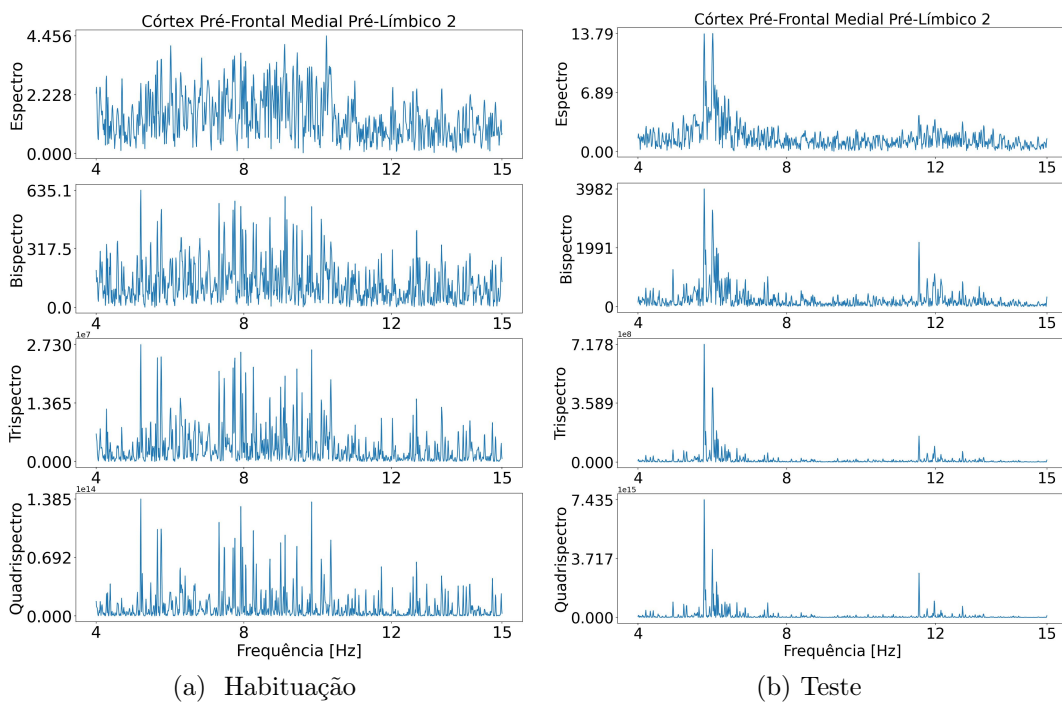


Figura 33 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 2, ampliados na banda de frequência entre 4 e 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.

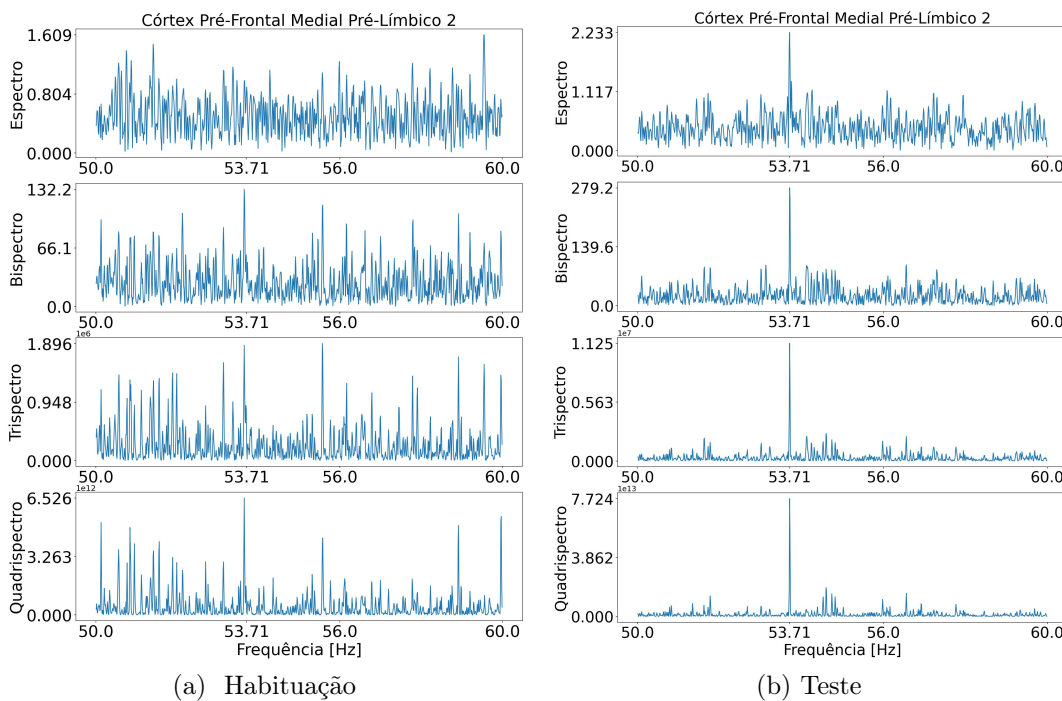


Figura 34 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 2, ampliados entre 50 e 60 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.

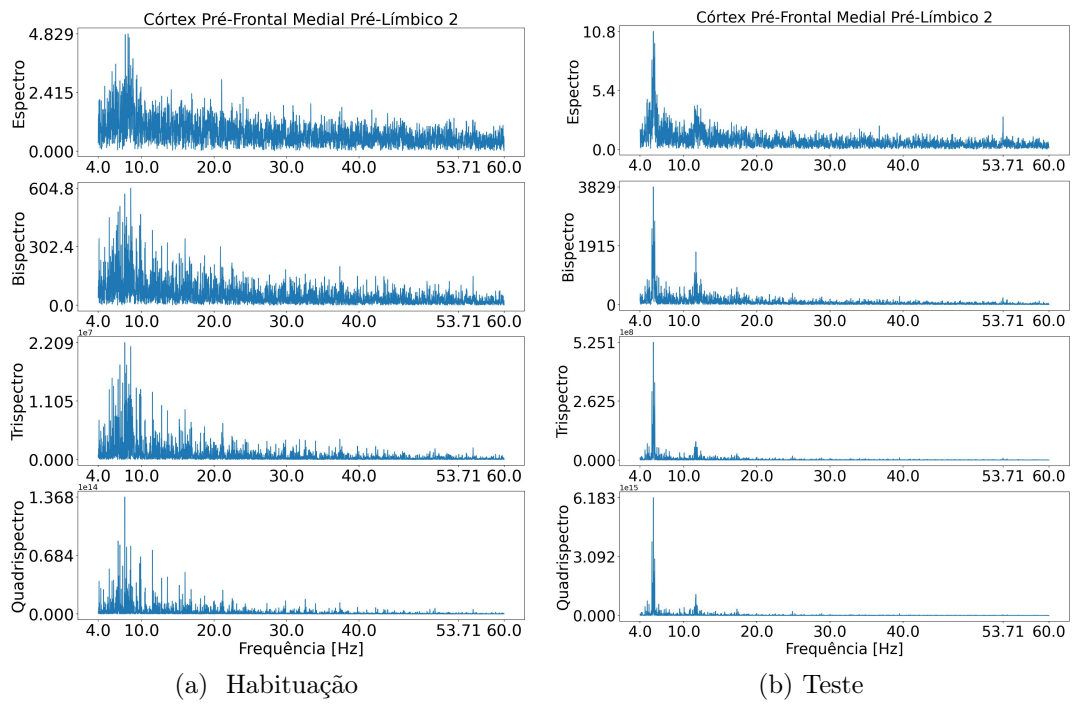


Figura 35 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 3, durante a habituação e o teste, respectivamente.

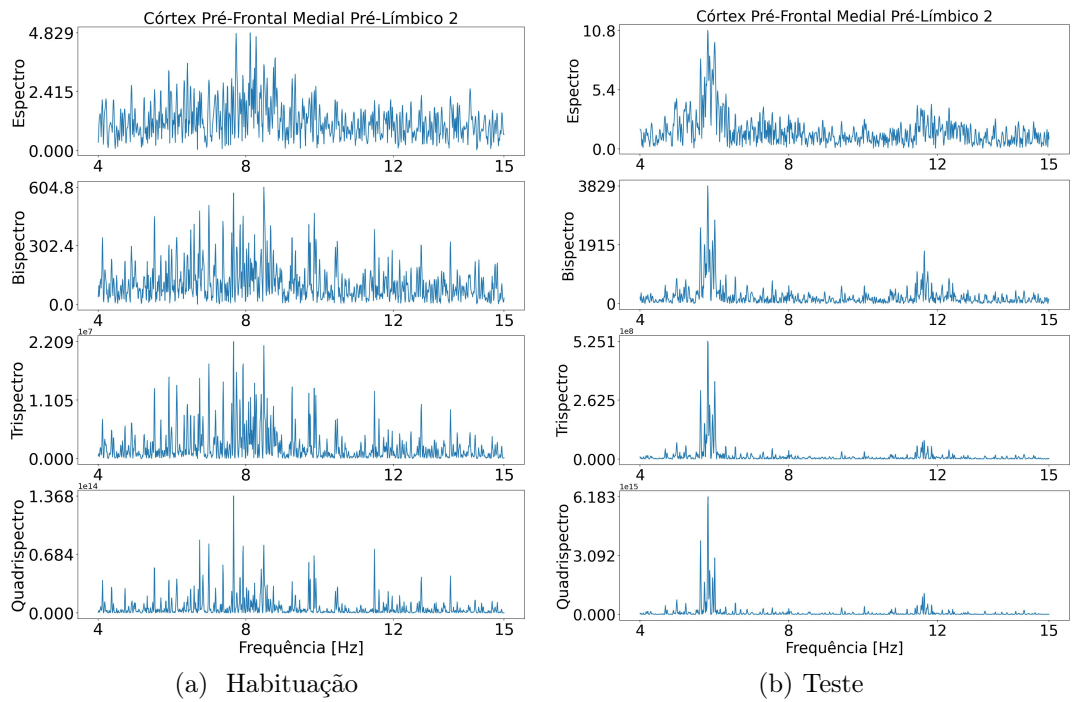


Figura 36 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 3, ampliados na banda de frequência entre 4 e 15 Hz durante a habituação e o teste, respectivamente.

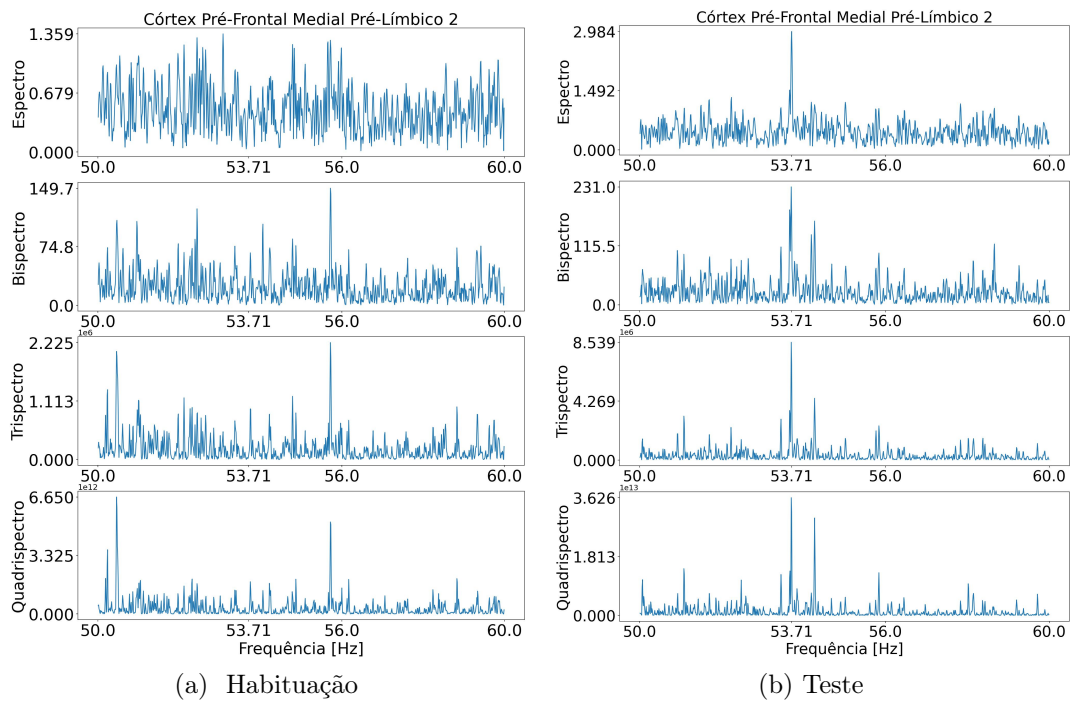


Figura 37 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para o evento 3, ampliados entre 50 e 60 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.

4.2.6 Córtex Pré-Frontal Infra-Límbico

Abaixo, são mostrados os espectros de alta ordem para os eventos sonoros 2 e 3, do sinal coletado no córtex pré-frontal infra-límbico, de forma completa, seguida por uma versão ampliada em 4 e 15 Hz e 50 e 60 Hz, respectivamente. Para o segundo evento sonoro, a Figura 38 apresenta os espectros de alta ordem no domínio do tempo para o sinal coletado no córtex pré-frontal infra-límbico. São observadas as mesmas alterações na dinâmica vistas no córtex pré-frontal pré-límbico (Figura 35), ou seja, o surgimento de um pico com amplitude aproximadamente três vezes maior na etapa de teste, se comparado com a etapa de habituação, aproximadamente na frequência de 6Hz. Ampliando a Figura 38, na banda de 4 a 15 Hz, é possível observar com mais detalhes a alteração da dinâmica na banda θ . Ampliando na banda γ , entre 50 e 60 Hz, observa-se na sub-Figura 40b da Figura 40 o aparecimento de um pico em 53,71 Hz, somente na etapa de teste, que é a frequência do estímulo sonoro percebida pelo animal. Já para o terceiro evento sonoro, a Figura 41 contém as TDHOSAs. Assim como ocorreu no segundo evento sonoro, no terceiro evento, um pico aparece em ≈ 6 Hz na etapa de teste, o que é visto na etapa de ambientação, mas com uma dispersão maior e amplitude no espectro menor do que a metade. Analisando a versão ampliada na banda θ , na Figura 42, observa-se um aumento de energia na banda entre 4 e 8Hz, aproximadamente em 6Hz. Por fim, a versão ampliada na banda γ , entre 50 e 60 Hz, na Figura 43, também se observa um pico de energia 53,71

Hz. Isso indica que além do IC, AL, ABL e córtex pré-frontal pré-límbico, o estímulo sonoro passa a se sincronizar, mesmo que de forma leve com o córtex pré-frontal infra-límbico durante a etapa de teste.

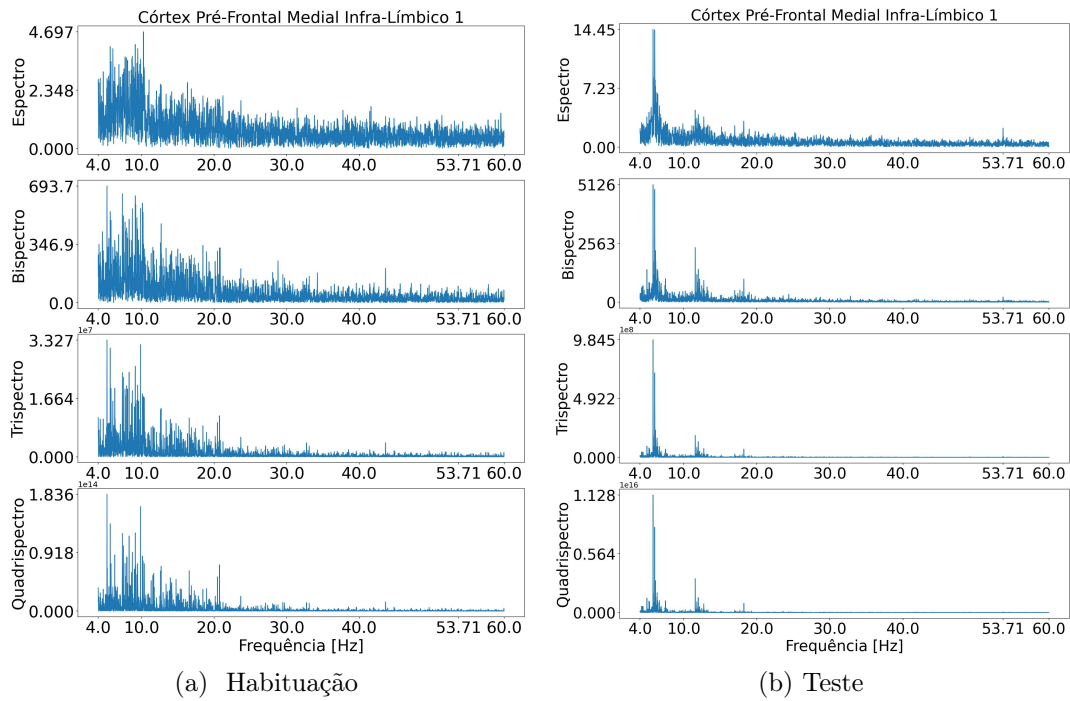


Figura 38 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 2, durante a habituação e o teste, respectivamente.

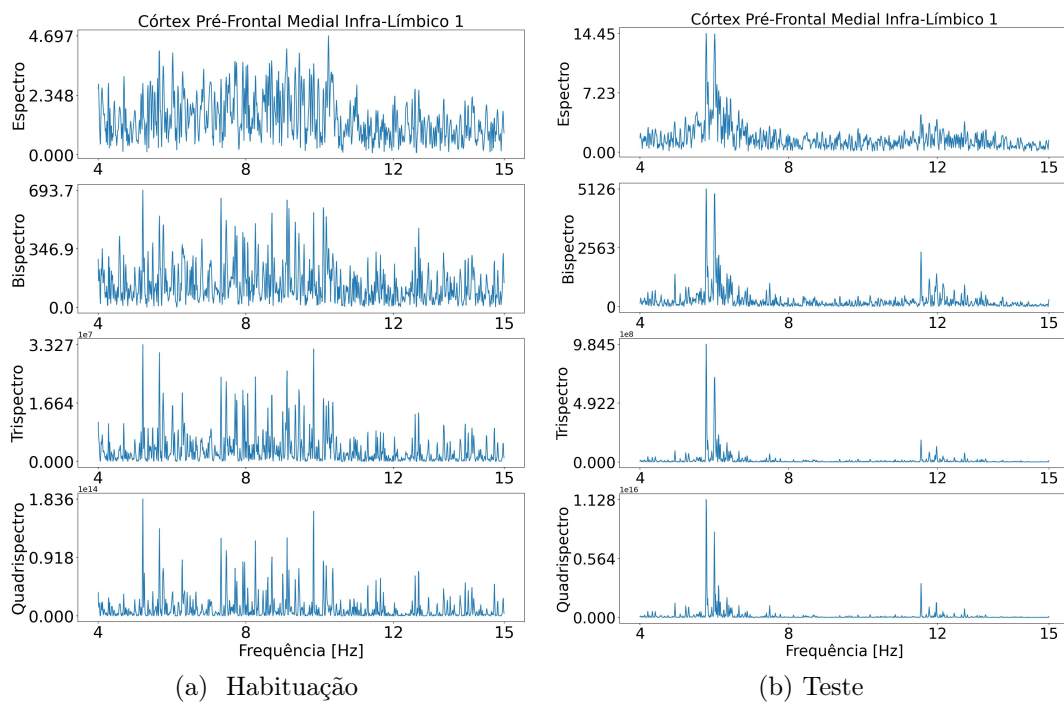


Figura 39 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 2, ampliados entre 4 e 15 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.

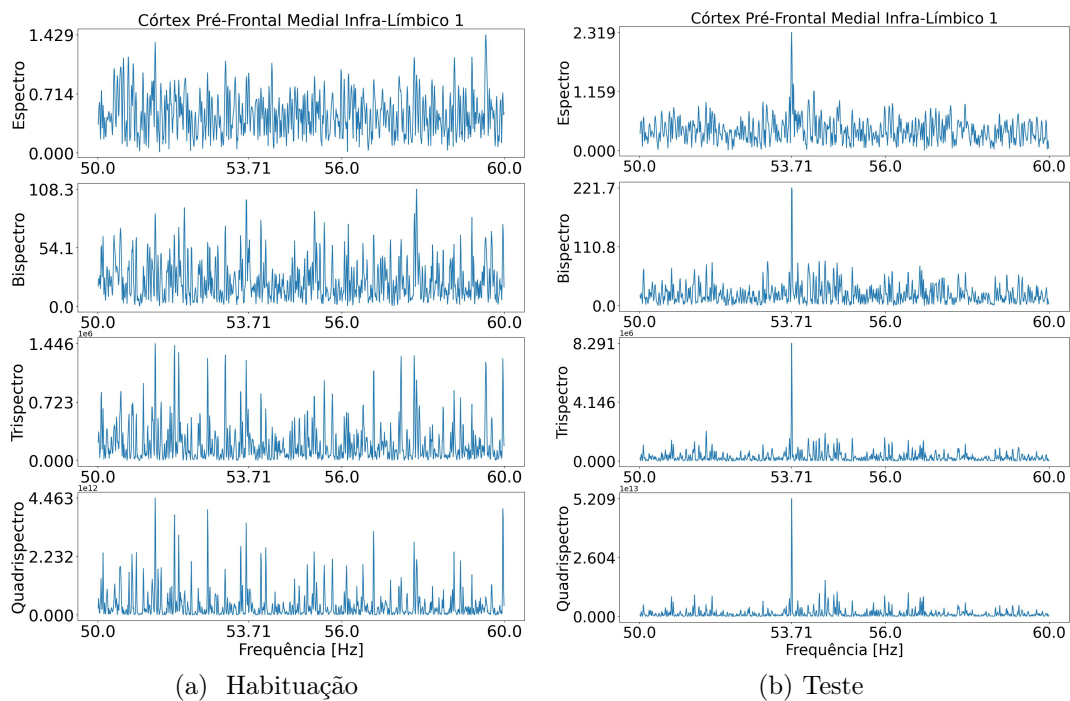


Figura 40 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 2, ampliados entre 50 e 60 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.

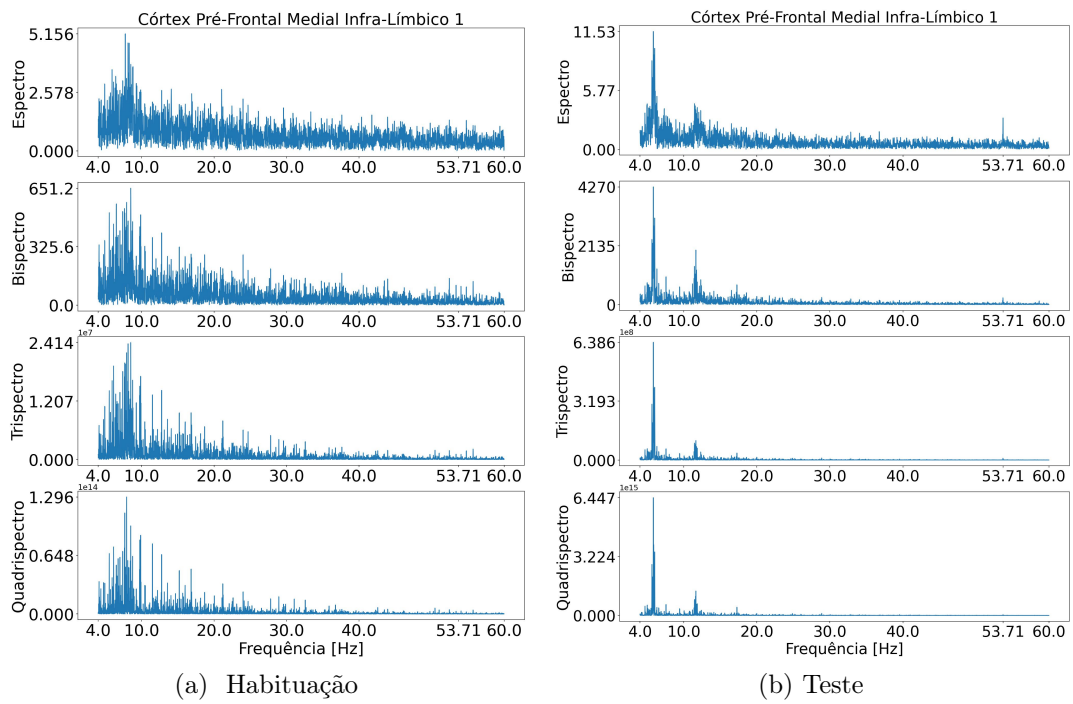


Figura 41 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 3, durante a habituação e o teste, respectivamente.

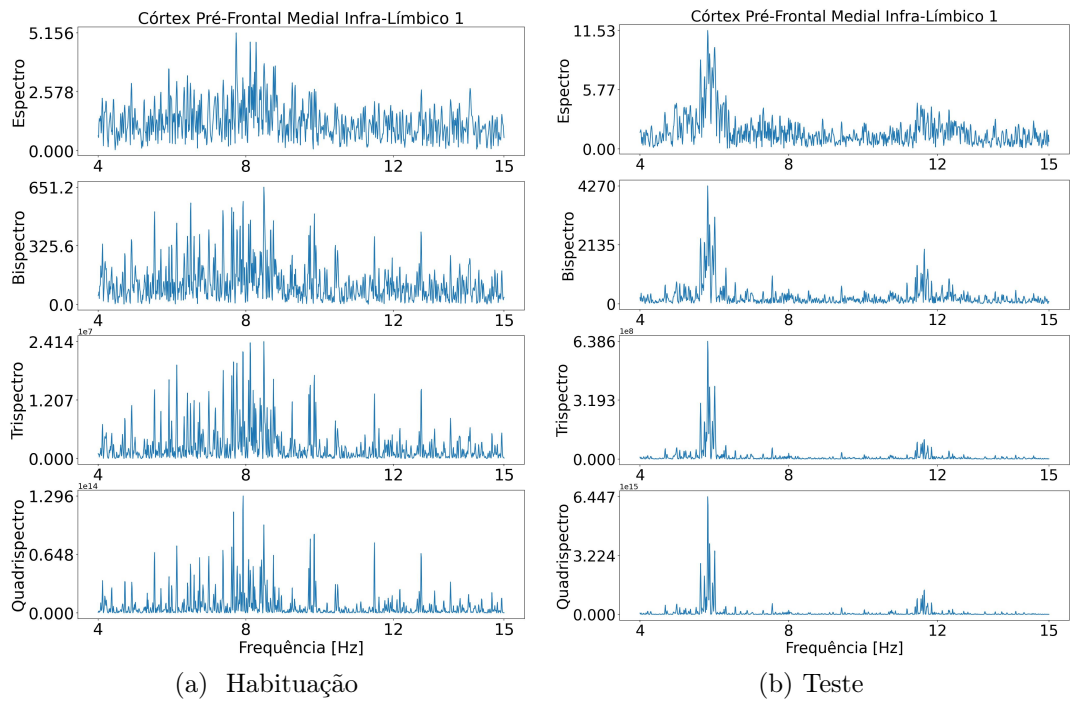


Figura 42 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 3, ampliados entre 4 e 15 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.

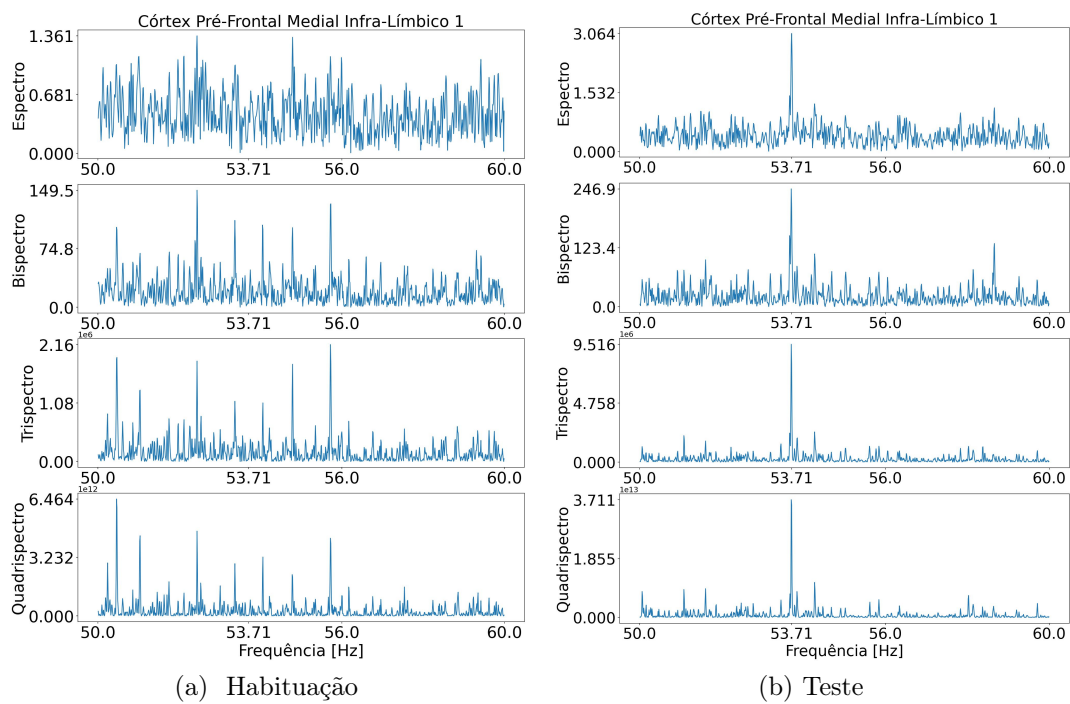


Figura 43 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para o evento 3, ampliados entre 50 e 60 Hz, durante a habituação e o teste, respectivamente.

4.2.7 Análise de comportamento de congelamento

O comportamento de congelamento durante a etapa de teste do AFC foi obtido a partir de uma análise realizada por um examinador cego ao experimento, utilizando a gravação em vídeo do animal durante as etapas experimentais.

A Figura 44 apresenta um gráfico indicando a ocorrência dos eventos sonoros, no painel superior, enquanto o painel inferior apresenta o comportamento de congelamento observado durante o experimento de teste. O comportamento de congelamento aparece de forma breve pouco antes de 200s, porém, após o primeiro evento sonoro, o animal apresenta o comportamento de congelamento persistente, indicando resposta aversiva ao estímulo sonoro, praticamente durante o resto do experimento, com janelas breves de movimento enquanto o som ainda estava tocando.

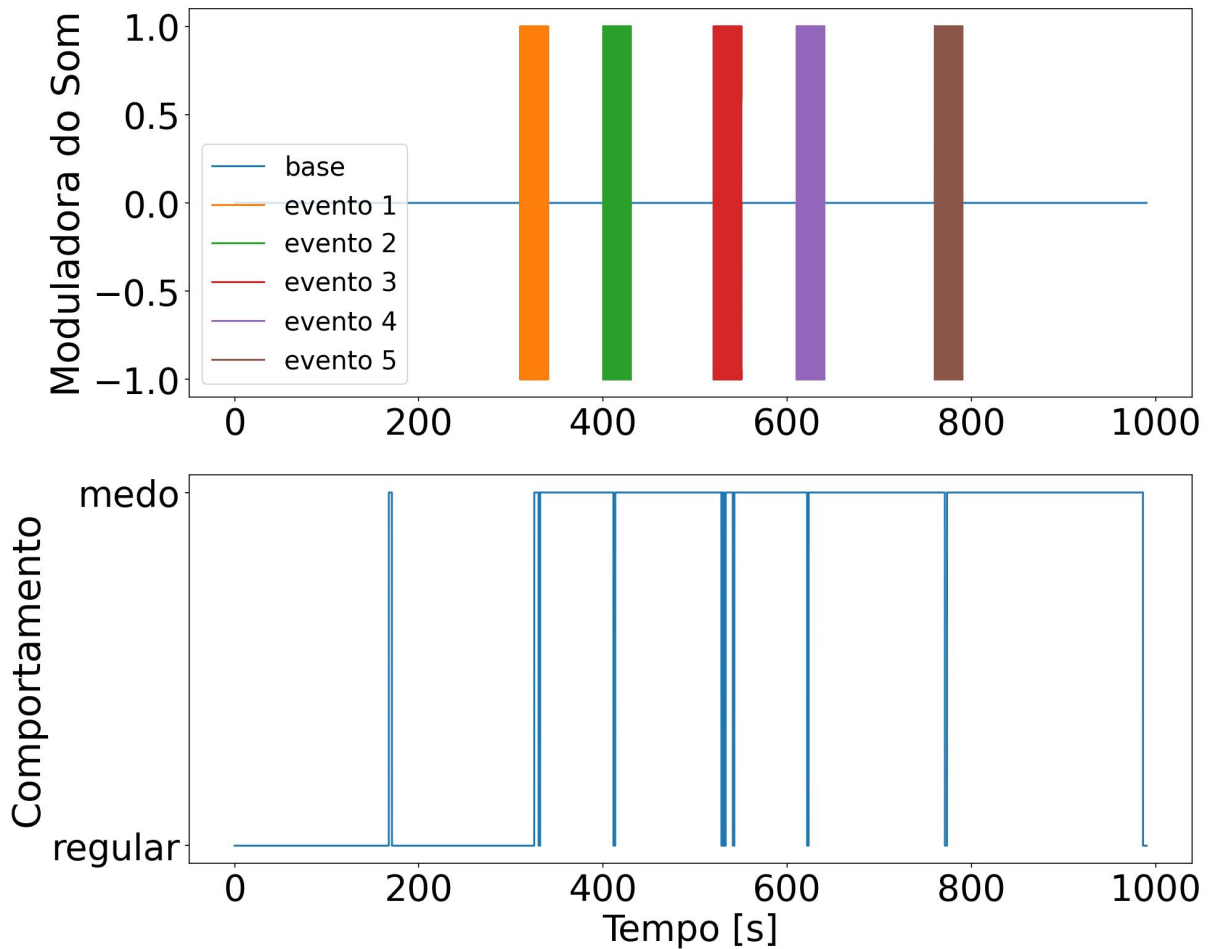


Figura 44 – Comportamento de congelamento do sujeito experimental durante a etapa de teste do AFC. O primeiro painel corresponde aos eventos de estímulo sonoro, seguido pelo segundo painel, que apresenta a presença de comportamento de congelamento do animal durante o AFC.

A Figura 45 complementa a Figura 44, apresentando também a trajetória do animal durante o AFC, tanto espacial como um histograma indicando o deslocamento em centímetros ao longo do tempo, além de substituir os estados de congelamento apresentados na Figura 44 por marcadores de início de comportamento, facilitando a visualização.

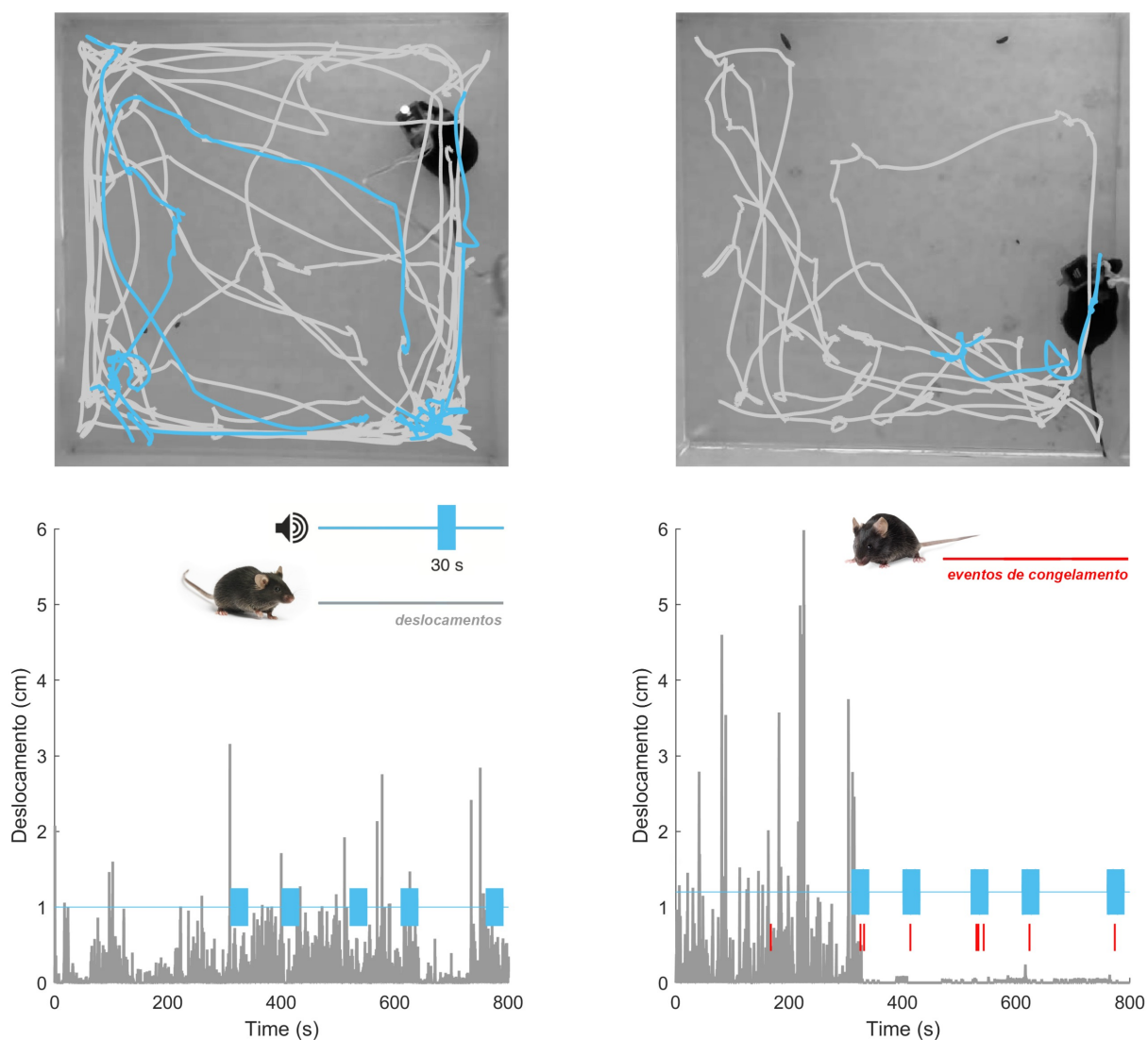


Figura 45 – Diagrama comportamental durante as etapas de habituação (esquerda) e teste (direita) durante um AFC. Painel superior: trajetória de exploração espacial do animal durante o AFC. Painel inferior: gráficos contendo histograma de deslocamento espacial em centímetros, bem como a forma de onda do estímulo sonoro em azul, e abaixo, o início dos comportamentos de congelamento em vermelho.

O resultado observado na Figura 44 é o resultado comportamental, enquanto os resultados observados utilizando os espectros de alta ordem foram obtidos a partir da análise da dinâmica dos dados eletrofisiológicos utilizando a TDHOSA. Ambos os resultados indicam a consolidação da memória de medo, porém, enquanto a análise comportamental indica de maneira inequívoca a presença de comportamento de medo por memória aversiva após o AFC, a TDHOSA traz várias informações específicas, como o surgimento de atividades dinâmicas não-lineares em determinados substratos cerebrais. Além disso, a análise simultânea do potencial evocado em vários substratos medidos confirmam os resultados obtidos em [Simões et al. \[2020\]](#) e em [Lockmann et al. \[2017\]](#) para o IC. No presente caso, os demais substratos analisados também apresentam mudanças na dinâmica

da resposta evocada após o AFC, tanto na banda θ , entre 4 e 8Hz [Chen et al., 2021, Scheffer-Teixeira and Tort, 2018], quanto na frequência da moduladora do estímulo sonoro, 53,71 Hz [Simões et al., 2020, Lockmann et al., 2017].

4.2.8 Análise Espectral de Alta Ordem no Domínio do Tempo do Congelamento

A seguir, é feita a análise espectral de alta ordem no domínio do tempo dos três primeiros eventos de congelamento do animal. O primeiro evento ocorre fora de uma janela de som, como pode ser visto nas Figuras 44 e 45, que pode ser interpretado de duas formas:

1. caso haja indícios de alteração na plasticidade neural, trata-se de um efeito contextual, uma vez que o estímulo sonoro não estava acontecendo;
2. caso o congelamento não tenha relação com o AFC, pode ser interpretado apenas como um artefato, ou erro por parte do examinador.

Os outros dois eventos começam ambos no primeiro evento sonoro. O motivo por se estudar dois comportamentos de congelamento no mesmo evento, é porque o primeiro congelamento é breve, enquanto o segundo acontece em seguida, de forma persistente por mais tempo. Abaixo, são mostrados os espectros de alta ordem para os canais do IC, AL, ABL, córtex pré-frontal pré-límbico e infra-límbico, segregados por eventos de congelamento.

4.2.8.1 Primeiro Evento de Congelamento

O primeiro evento ocorre entre 100 s e 200 s, antes do primeiro evento sonoro, ou seja, o animal ainda não experienciou nenhum estímulo condicionado que possa despertar medo quando tal comportamento foi registrado. A Figura 46 mostra os espectros para os três segundos que antecedem e sucedem o início do primeiro comportamento de congelamento do animal. Na banda θ , existem diferenças dinâmicas entre o período antes e depois do congelamento, o que condiz com o fato do animal ter congelado, porém, não apareceu nenhuma modulação na frequência de 53,71 Hz, ou seja, o animal não apresentou oscilações neurais que remetessem ao estímulo condicionado do AFC. A Figura 47 mostra os espectros de alta ordem da AL, a Figura 48 apresenta os espectros da ABL, enquanto as Figuras 49 e 50 mostram os espectros dos substratos pré-límbico e infra-límbico do córtex pré-frontal medial, respectivamente. Todos esses substratos cerebrais, excluindo o IC, são envolvidos no processamento de estresse e medo [Chen et al., 2021], portanto, o aparecimento de comportamento de medo, mesmo de causas desconhecidas, explica alterações na dinâmica da banda θ , o que é observado em todos os substratos. Porém, as mudanças observadas não são diretamente relacionadas ao AFC, uma vez que não apareceu nenhum pico de amplitude em 53,71 Hz em nenhum dos espectros.

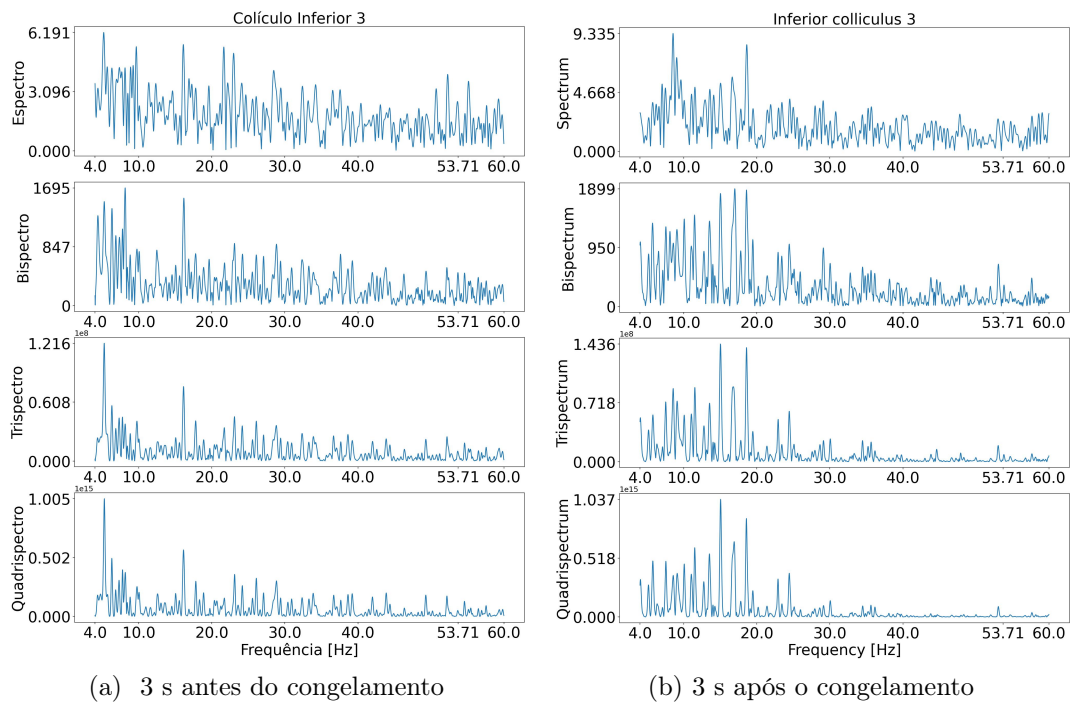


Figura 46 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrisspectro do IC no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do primeiro comportamento de congelamento.

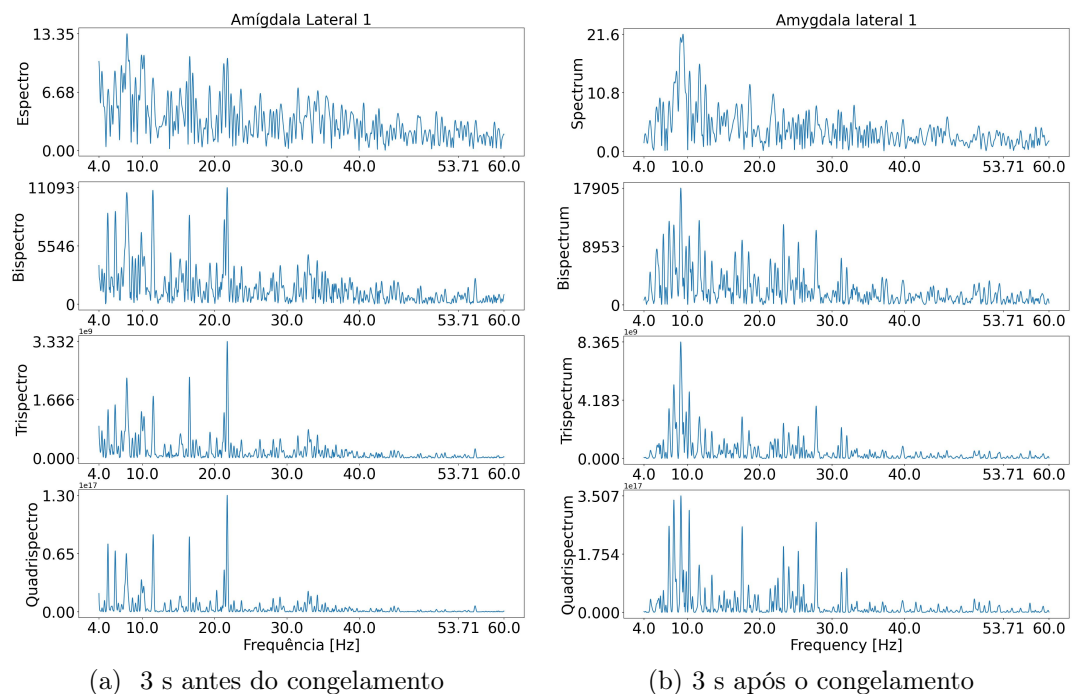


Figura 47 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrisspectro do complexo lateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do primeiro comportamento de congelamento.

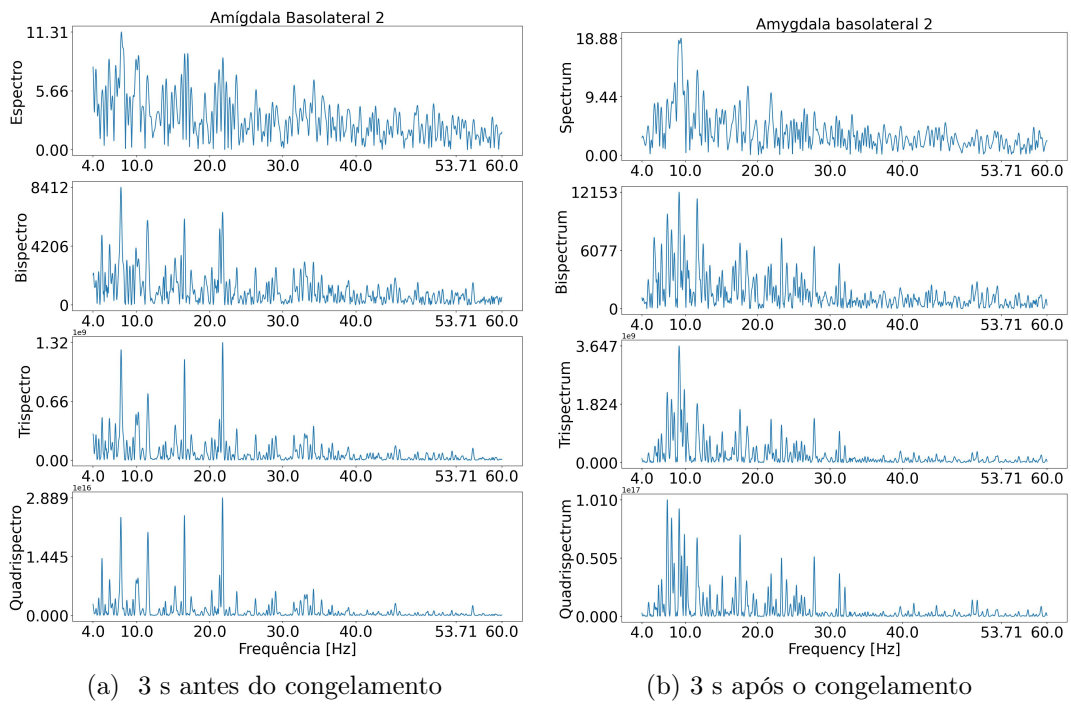


Figura 48 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo basolateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do primeiro comportamento de congelamento.

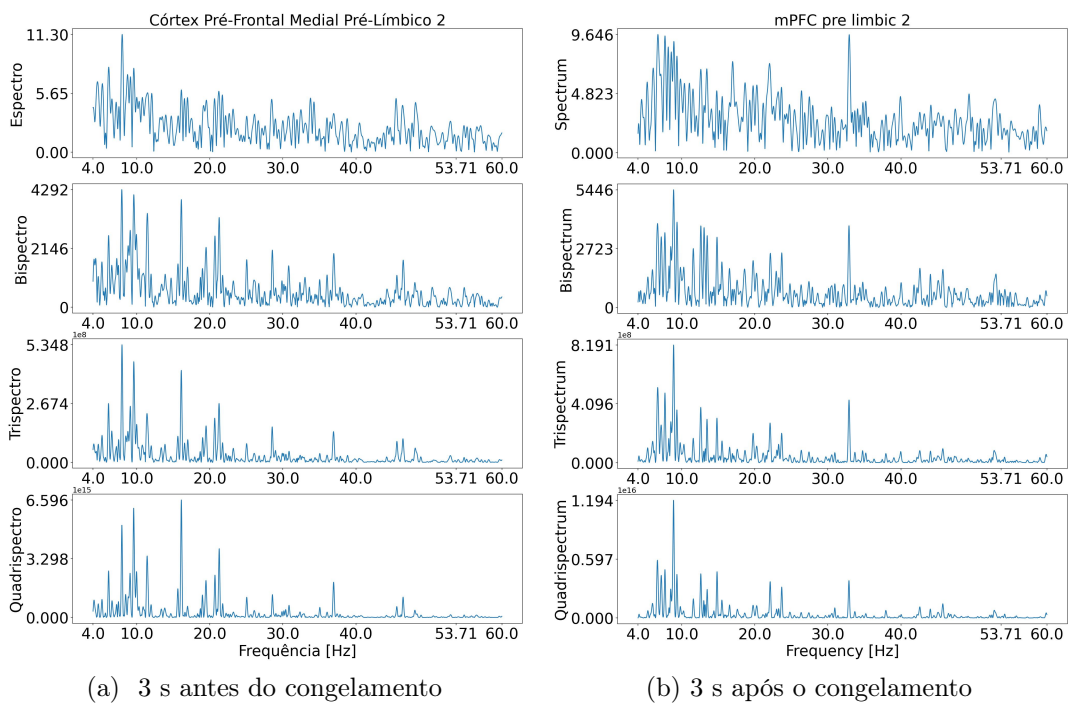


Figura 49 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do primeiro comportamento de congelamento.

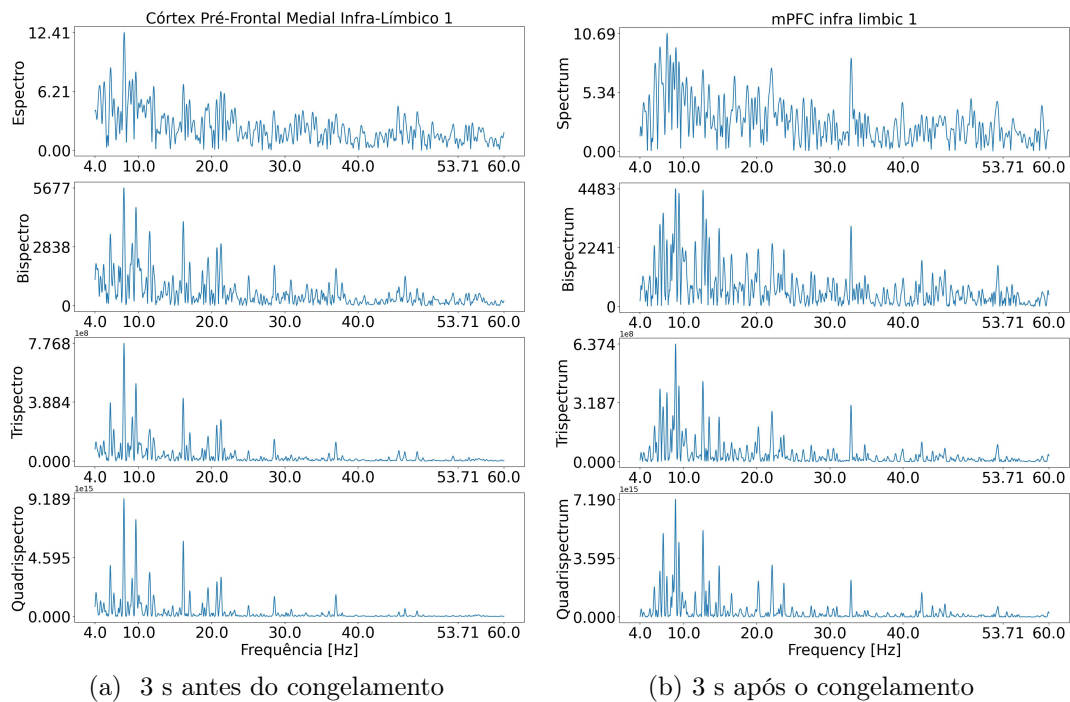


Figura 50 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do primeiro comportamento de congelamento.

4.2.8.2 Segundo Evento de Congelamento

O segundo comportamento de congelamento ocorre entre 300 s e 400 s, durante o primeiro evento sonoro. A Figura 51 mostra os espectros para os três segundos que antecedem e sucedem início do primeiro comportamento de congelamento do animal. Na banda θ , não existem diferenças dinâmicas visualmente relevantes, porém, na frequência de 53,71 Hz aparecem picos de amplitude similar, tanto antes quanto depois da manifestação do comportamento de congelamento. A Figura 52 mostra os espectros de alta ordem da AL, a Figura 53 apresenta os espectros da ABL, enquanto as Figuras 54 e 55 mostram os espectros dos substratos pré-límbico e infra-límbico do córtex pré-frontal medial, respectivamente. Em nenhum desses substratos cerebrais aparecem diferenças dinâmicas consideráveis na banda θ , comparando os três segundos que antecedem e os que sucedem o comportamento de congelamento. Além disso, embora apareça de maneira clara no IC, não apareceu nenhum pico de amplitude em 53,71 Hz em nenhum dos espectros dos demais substratos, diferente do que foi visto ao se analisar a TDHOSA dos 30 s de som, o que mostra a efetividade do potencial evocado em estado estacionário (SSEP), onde tal comportamento dinâmico que não apareceu em uma análise de janela temporal curta (3 s) foi identificado em uma janela mais longa (30 s).

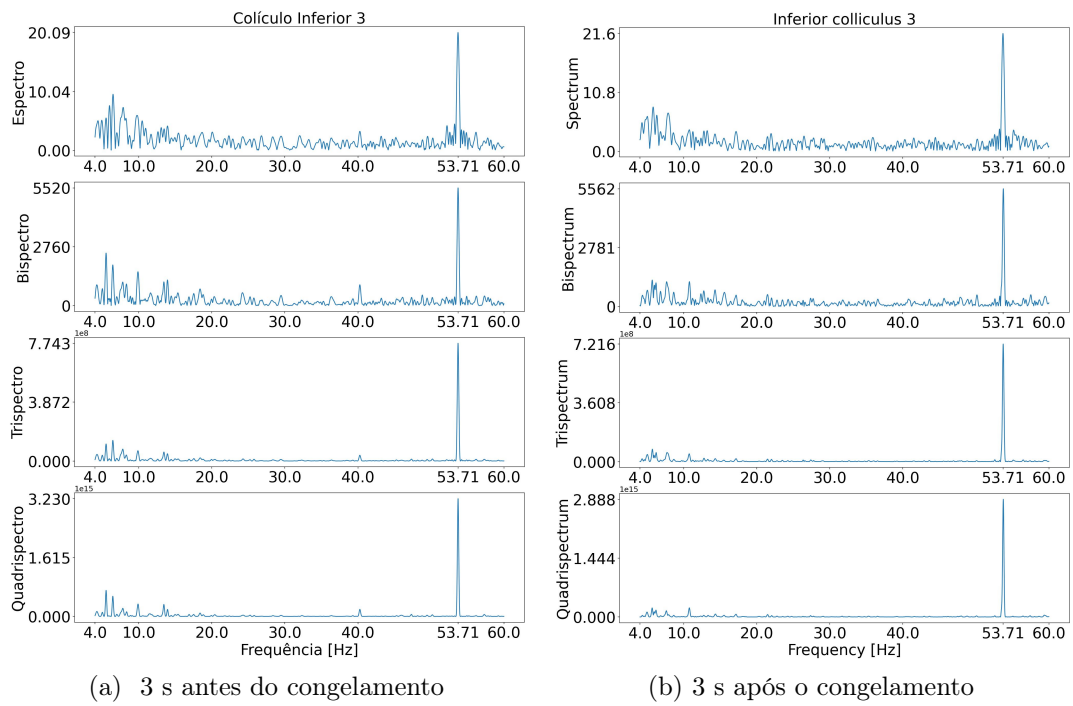


Figura 51 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do segundo comportamento de congelamento.

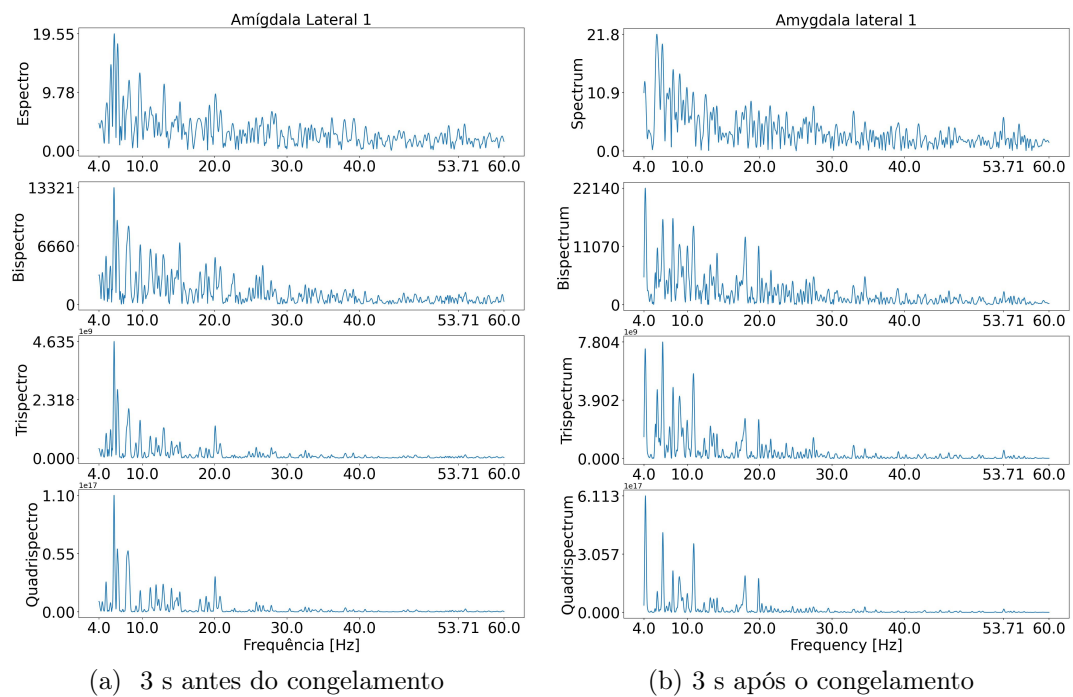


Figura 52 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo lateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do segundo comportamento de congelamento.

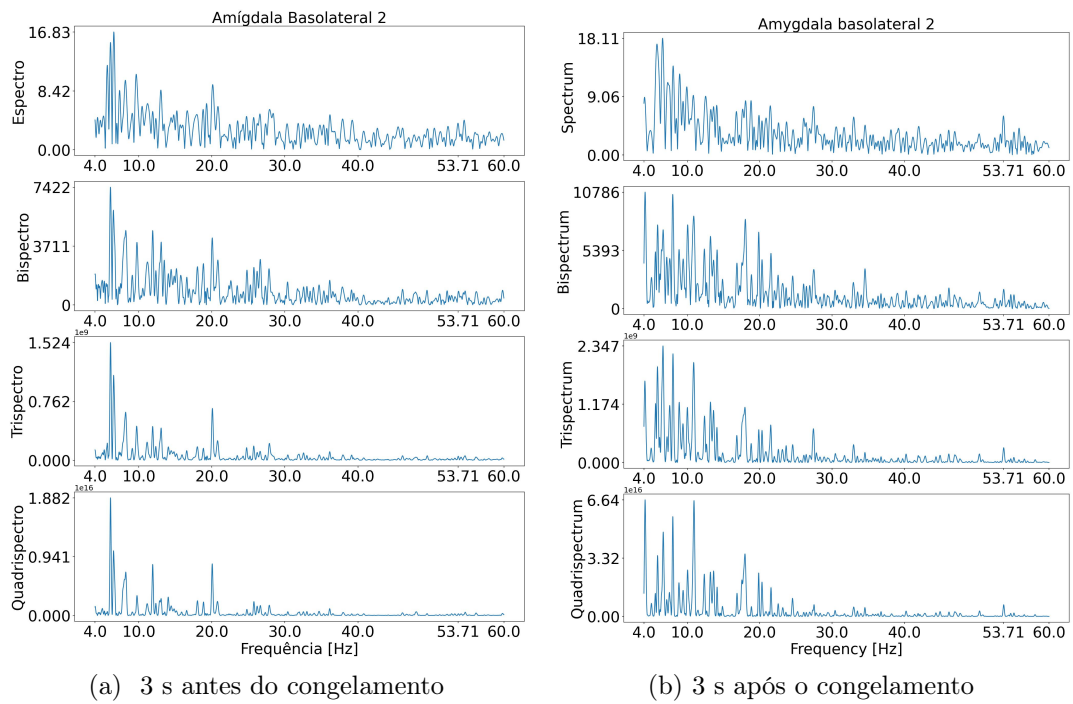


Figura 53 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo basolateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do segundo comportamento de congelamento.

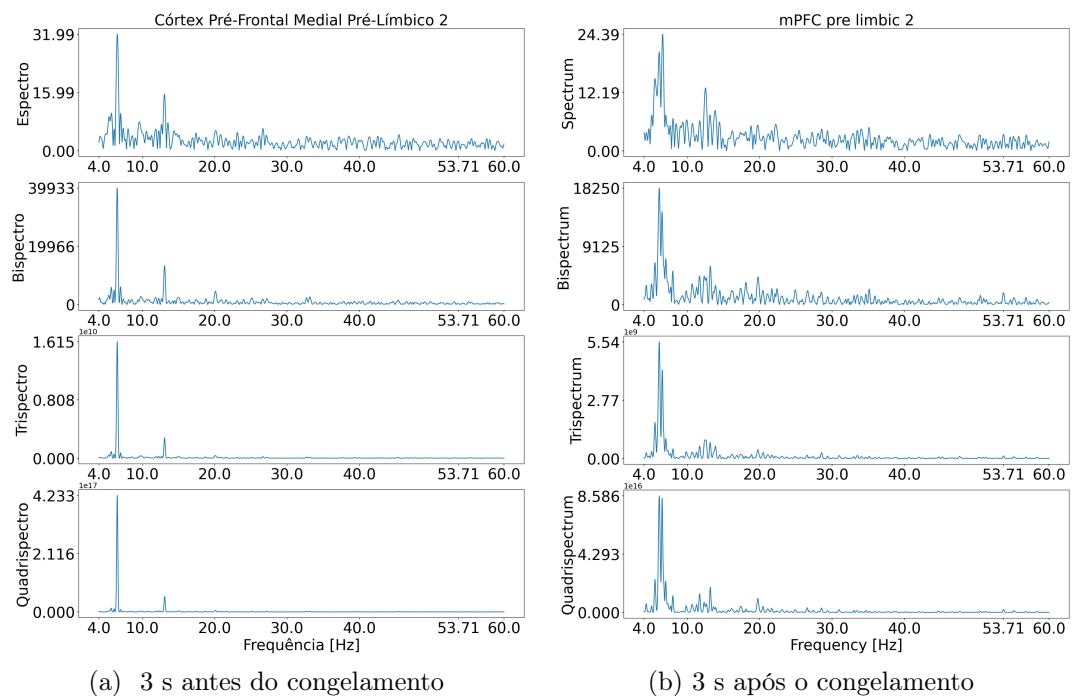


Figura 54 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do segundo comportamento de congelamento.

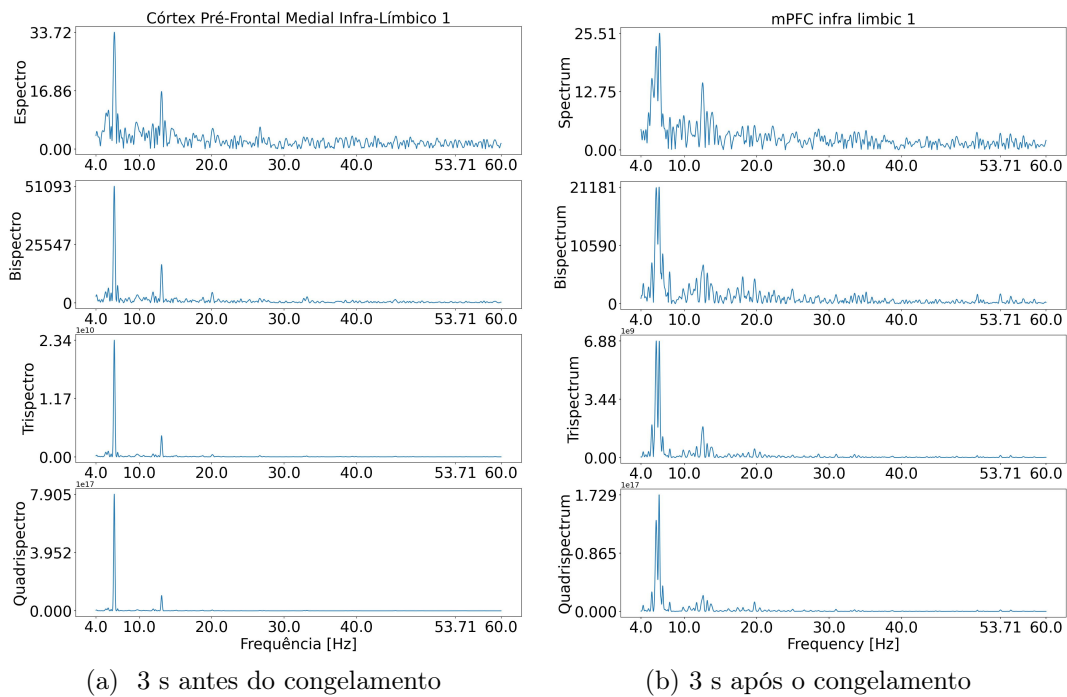


Figura 55 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do segundo comportamento de congelamento.

4.2.8.3 Terceiro Evento de Congelamento

Por fim, o terceiro comportamento de congelamento ocorre logo após o segundo, também durante o primeiro evento sonoro, porém com uma duração maior, que vai até o segundo evento sonoro. A Figura 56 mostra os espectros para os três segundos que antecedem e sucedem início do primeiro comportamento de congelamento do animal, e diferente do segundo congelamento, na banda θ , aparece um pequeno pico nos três segundos após o congelamento, que é aproximadamente o dobro da amplitude presente nos três segundos antecessores, na banda θ do espectro. Além disso, na frequência de 53,71 Hz também aparecem picos de amplitude similar, tanto antes quanto depois da manifestação do comportamento de congelamento. As Figura 57, 58, 59 e 60 mostram os espectros da AL, ABL, dos substratos pré-límbico e infra-límbico do córtex pré-frontal medial, respectivamente. As TDHOSAs dos complexos lateral e basolateral da amígdala apresentaram diferenças dinâmicas em θ , de modo que a energia dispersa na banda entre aproximadamente 4 e 20 Hz aos 3 s antes do congelamento passam a se concentrar em um único pico em θ , junto de um aumento de amplitude. Para os substratos do córtex pré-frontal medial, não aparecem diferenças dinâmicas consideráveis na banda θ , comparando os três segundos que antecedem e os que sucedem o comportamento de congelamento. Assim como no segundo congelamento, não apareceu nenhum pico de amplitude em 53,71 Hz em nenhum dos espectros dos substratos, excluindo o IC.

Em resumo, para o terceiro evento de congelamento, cuja duração do comportamento foi persistente por um período de tempo maior do que o segundo evento, houveram mudanças perceptíveis na dinâmica em θ em todos os espectros do complexo amigdalóide, sem mudanças significativas visualmente nos demais substratos. Já para a frequência do estímulo condicionado, somente o IC apresentou um potencial evocado em tal frequência, mas sem diferenças qualitativas e quantitativas relevantes entre o período antecessor e sucessor do início do comportamento.

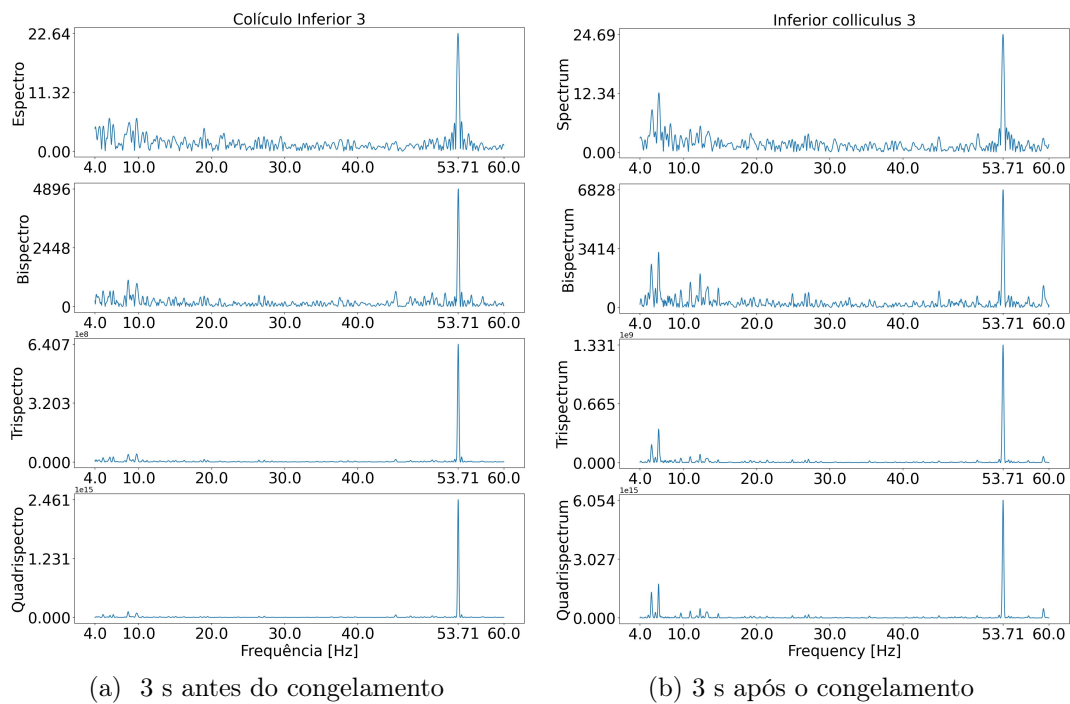


Figura 56 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do IC no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do terceiro comportamento de congelamento.

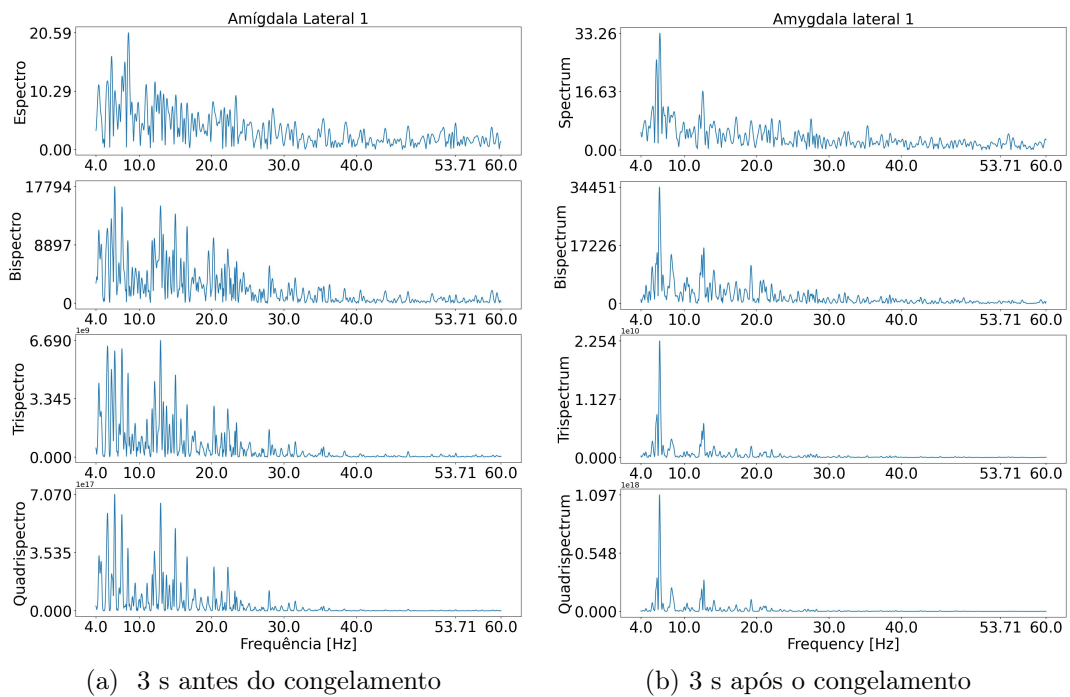


Figura 57 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo lateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do terceiro comportamento de congelamento.

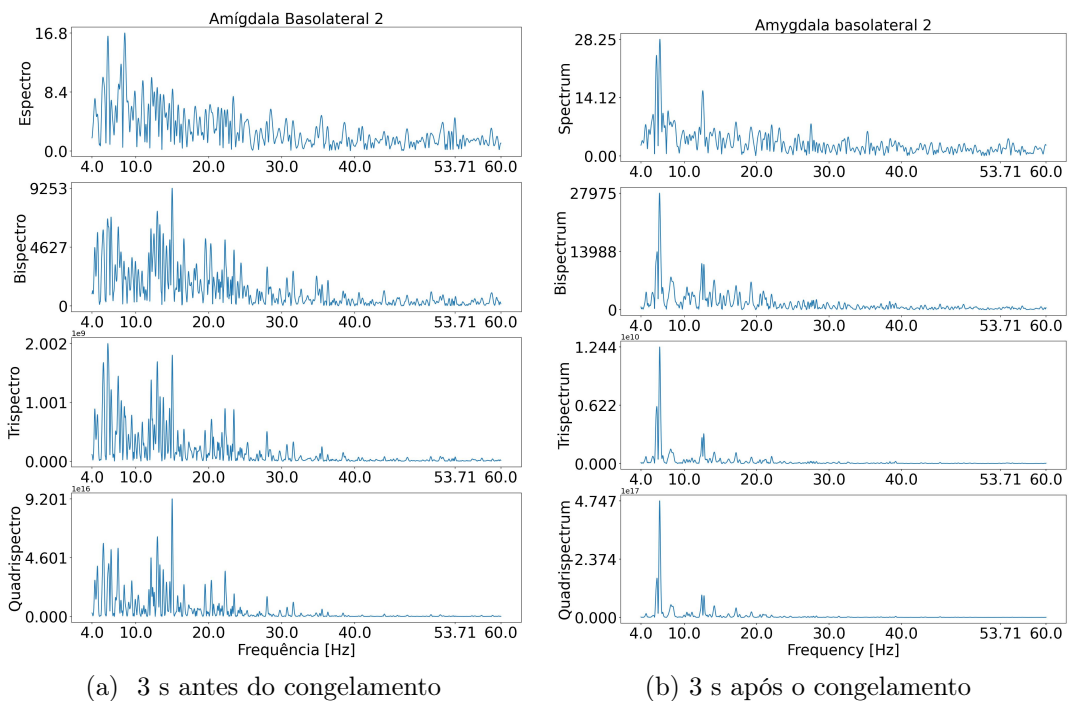


Figura 58 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do complexo basolateral da amígdala no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do terceiro comportamento de congelamento.

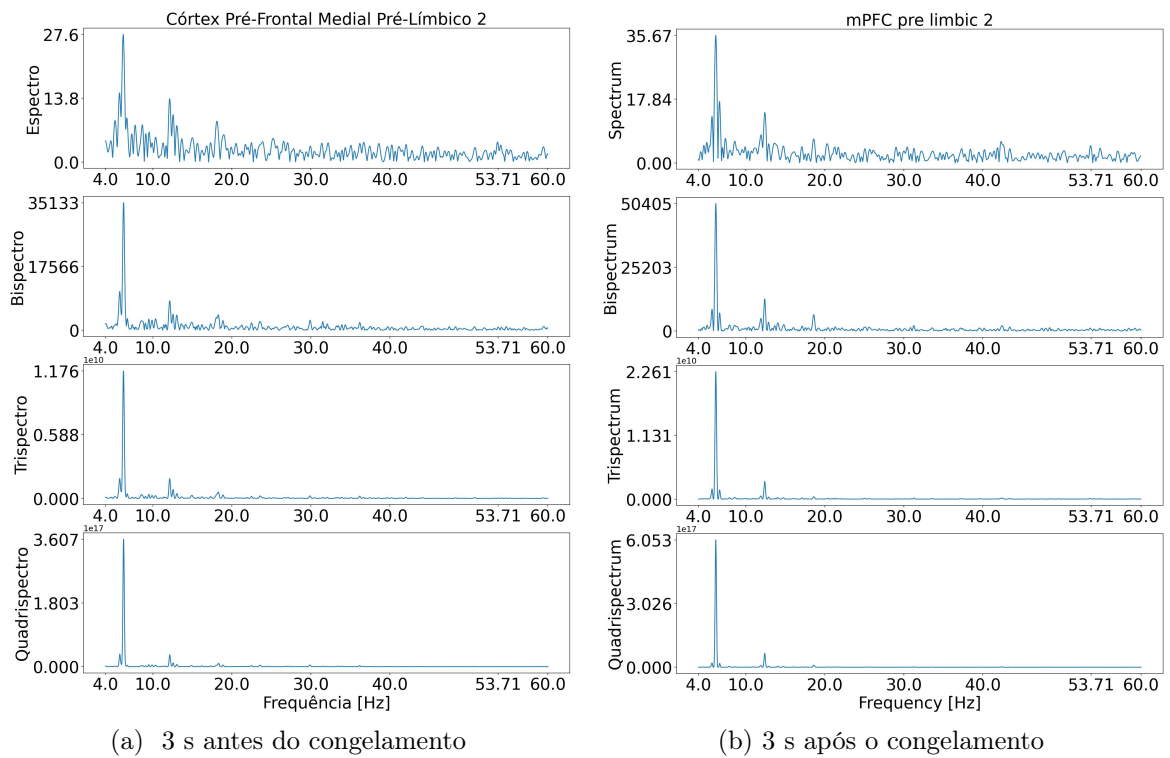


Figura 59 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal pré-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do terceiro comportamento de congelamento.

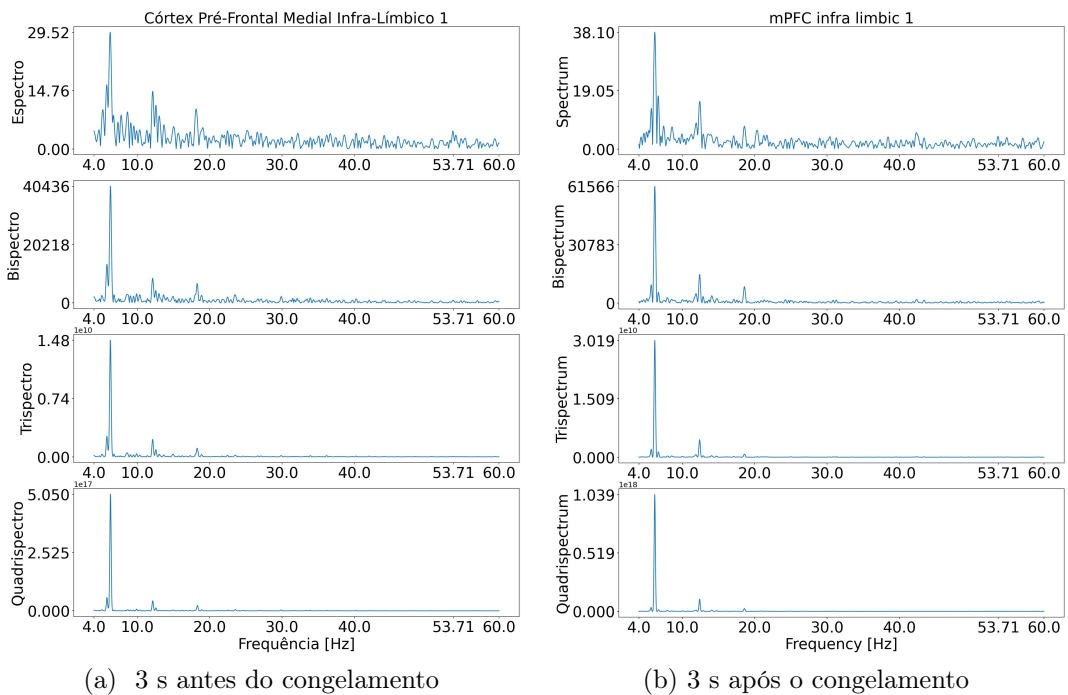


Figura 60 – Espectro, bispectro, trispectro e quadrispectro do córtex pré-frontal infra-límbico no domínio do tempo para 3 s antes e 3 s depois do início do terceiro comportamento de congelamento.

4.2.9 Considerações

A análise espectral de alta ordem no domínio do tempo realizada nos substratos cerebrais da via acústico límbica durante o AFC indicaram mudanças na dinâmica neural, após o condicionamento aversivo, indicando a formação de memória e plasticidade neural. As mudanças observadas ocorreram tanto na banda θ , responsável pelo processamento da resposta, bem como na frequência da moduladora do estímulo condicionado, o que indica que houve um acoplamento entre o colículo inferior, o complexo amigdalóide e o córtex pré-frontal medial durante o AFC, ou seja, houve uma facilitação do processamento do estímulo sonoro.

As principais características observadas ao analisar a base de dados é a não-linearidade dos sinais, com acoplamentos de frequências, onde se hipotetiza que tal acoplamento se dá entre frequências pertencentes à θ e a frequência moduladora. Porém, somente com o uso da TDHOSA, não é possível verificar tais acoplamentos, fazendo-se necessário o uso de técnicas complementares na análise.

A análise de congelamento corrobora com a análise em estado estacionário, indicando que além das mudanças dinâmicas, há a exibição de comportamento condicionado, diretamente relacionada às características dinâmicas que aparecem predominantemente durante os 30 s de apresentação do estímulo sonoro, durante a etapa de teste. O único evento de congelamento que não está associado com um evento sonoro, apresenta alterações na dinâmica em θ no córtex pré-frontal o que indica uma possível contaminação contextual, ou mesmo uma sensibilização por parte do animal ao longo do protocolo.

4.3 Modelagem Polinomial Não-Linear

4.3.1 Introdução

A análise utilizando modelos gerou resultados coerentes com os obtidos nas Seções 4.1 e 4.2, porém, sem nenhuma novidade considerável. Por conta disso, objetivamos apenas demonstrar os resultados parciais obtidos e o modelo, ao longo das etapas da Lista Enumerada 3.9. Um caso específico, onde a entrada é apenas o primeiro estímulo sonoro da etapa de teste é usado como entrada, para modelar um dos canais do colículo inferior, é usado para mostrar os resultados obtidos. Várias configurações foram testadas, mas é mostrada uma configuração onde o grau máximo de não-linearidade é 2 e o máximo de atrasos é 10. Tal escolha se dá pelo fato da estrutura do modelo não-linear ser simples o suficiente para demonstrar como os algoritmos funcionam, além de ser um exemplo representativo das dificuldades observadas no processo de modelagem.

4.3.2 Critério de Taxa de Redução de Erro (ERR)

A Figura 61 mostra os termos ordenados pelo Critério de Taxa de Redução de Erro, de modo que os regressores são ordenados pela redução da variância dos resíduos de estimação. Vale notar que na imagem aparecem somente os regressores selecionados pelo Critério de Informação de Akaike (Figura 62), uma vez que todos os regressores com atraso de até dez amostras e com grau de não-linearidade polinomial até 2 são avaliados. Vale notar que a taxa de redução de erro não é decrescente, como seria intuitivo, uma vez que para alcançar isso, seria necessário algoritmos exaustivos com alto custo computacional e longo tempo de execução. O modelo escolhido possui um termo de ganho (ou *offset*), termos lineares, termos quadráticos e termos cruzados, todos respeitando as restrições estipuladas para a geração de regressores candidatos.

OrderedTerms:

```
00: err: 2.667280e-01 - u[k-4]
01: err: 3.201441e-03 - u[k-6] * u[k-5]
02: err: 6.052364e-04 - u[k-4] * u[k-0]
03: err: 3.560086e-04 - u[k-9]
04: err: 2.602012e-03 - u[k-6]
05: err: 4.125342e-04 - u[k-0]
06: err: 3.298157e-04 - 1
07: err: 4.768085e-04 - u[k-3] * u[k-1]
08: err: 1.512460e-03 - u[k-2]**2
09: err: 1.980064e-04 - u[k-9] * u[k-2]
10: err: 3.423632e-04 - u[k-8] * u[k-3]
11: err: 3.097192e-04 - u[k-7] * u[k-4]
12: err: 8.620001e-05 - u[k-7]
13: err: 4.471022e-05 - u[k-4]**2
14: err: 9.968703e-04 - u[k-5]**2
15: err: 4.924682e-04 - u[k-6]**2
16: err: 1.102282e-03 - u[k-7] * u[k-2]
```

Figura 61 – Termos ordenados (e já truncados) gerados pelo Critério de Taxa de Redução de Erro.

4.3.3 Critério de Informação de Akaike

Após a geração dos regressores candidatos e da ordenação dos mesmos, tendo como regra de ordenação a redução da variância dos resíduos, o Critério de Informação de Akaike é utilizado para determinar a quantidade de regressores que irá de fato compor o modelo. Analisando a Figura 62, observa-se um mínimo em 17 parâmetros, ou seja, a partir do 17^o termo, a adição de regressores não é justificada, podendo não fazer diferença no desempenho do modelo, ou até mesmo piorá-lo. Portanto, determina-se que o modelo é composto por 17 regressores, os mesmos mostrados na Figura 61.

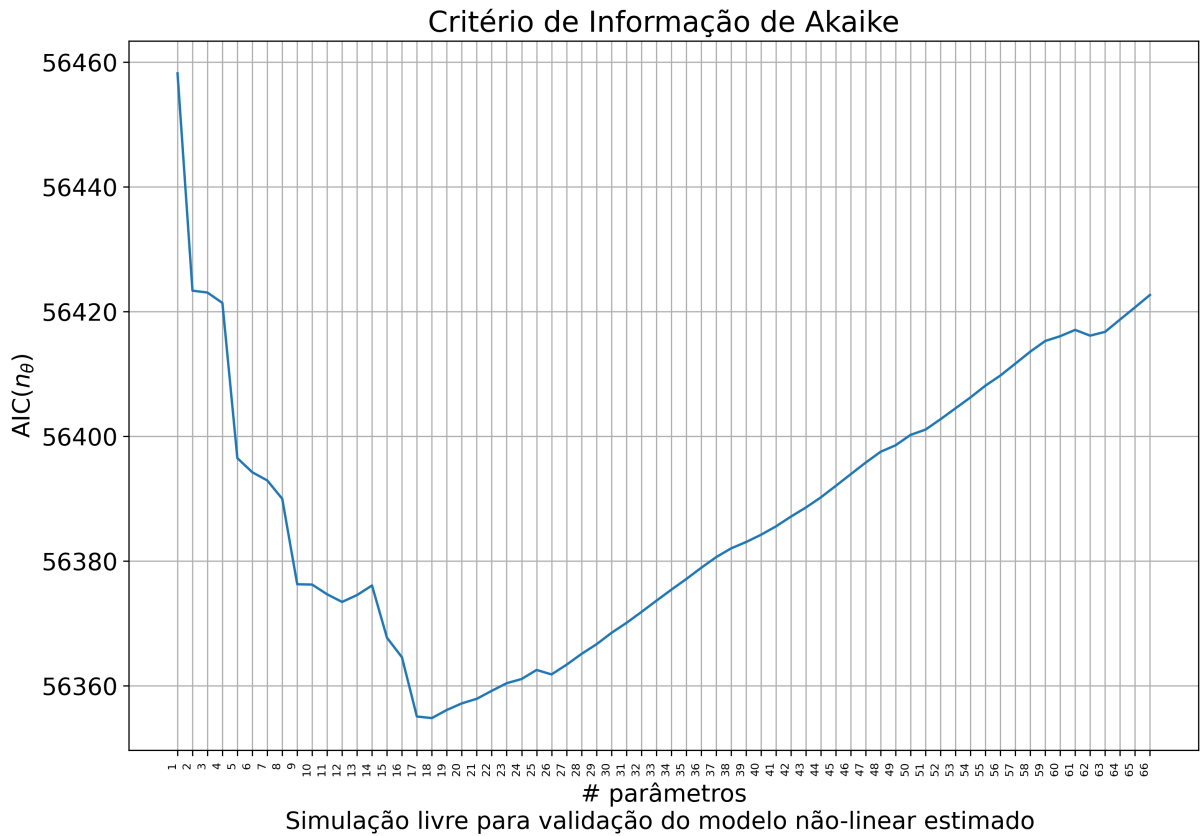


Figura 62 – Critério de Informação de Akaike para os termos inseridos no modelo NARX na ordem determinada pelo ERR. 17 termos foram escolhidos.

4.3.4 Estimação dos Parâmetros do Modelo

Tendo a estrutura do modelo definida, faz-se necessário a estimação dos parâmetros do mesmo. A Figura 63 mostra os termos do modelo. A primeira parte mostra os termos com seu índice original, antes da ordenação pelo ERR, e a segunda parte mostra a composição do modelo, com os parâmetros omitidos.

Termos:

```

6: u[k-4]
35: u[k-6] * u[k-5]
49: u[k-4] * u[k-0]
1: u[k-9]
4: u[k-6]
10: u[k-0]
0: 1
51: u[k-3] * u[k-1]
63: u[k-2]**2
17: u[k-9] * u[k-2]
24: u[k-8] * u[k-3]
30: u[k-7] * u[k-4]
3: u[k-7]
61: u[k-4]**2
60: u[k-5]**2
59: u[k-6]**2
32: u[k-7] * u[k-2]

```

$$\begin{aligned}
 y(k) = & u[k-4] + u[k-6] * u[k-5] + u[k-4] * u[k-0] + u[k-9] + \\
 & u[k-6] + u[k-0] + 1 + u[k-3] * u[k-1] + \\
 & u[k-2]**2 + u[k-9] * u[k-2] + u[k-8] * u[k-3] + u[k-7] * u[k-4] + \\
 & u[k-7] + u[k-4]**2 + u[k-5]**2 + u[k-6]**2 + \\
 & u[k-7] * u[k-2]
 \end{aligned}$$

Figura 63 – Regressores do modelo NARX escolhidos com o auxílio do ERR e do Critério de Informação de Akaike.

A Figura 64 mostra os parâmetros estimados para o modelo da Figura 63, através do estimador de Mínimos Quadrados, com os parâmetros na mesma ordem em que os regressores são apresentados.

```

Theta ordenado: [-10.9574655  -15.71548992 -34.44220435  14.28895678 -31.2575508
 19.32768657  86.33558546  19.03200122  36.91518354 -27.81919615
 34.67543084 -27.0025052   9.18137444 -61.50078517 -74.35582633
 -52.30632297 -61.53412871]

```

Figura 64 – Parâmetros para o modelo NARX obtidos através do estimador de Mínimos Quadrados.

4.3.5 Simulação Livre

Com o modelo em mãos, é feita a simulação livre do mesmo. A Figura 65 mostra o desempenho do modelo no domínio do tempo. É possível perceber que o modelo possui um comportamento periódico bem definido, diferente do sinal de saída usado para estimação do modelo. Isso se dá pela dificuldade em um modelo polinomial representar um sinal com muitas componentes de frequências, com ruído considerável e de características espectrais

complexas. A análise usando TDHOSA apresentada na Subseção 4.3.6 detalha melhor tal dificuldade.

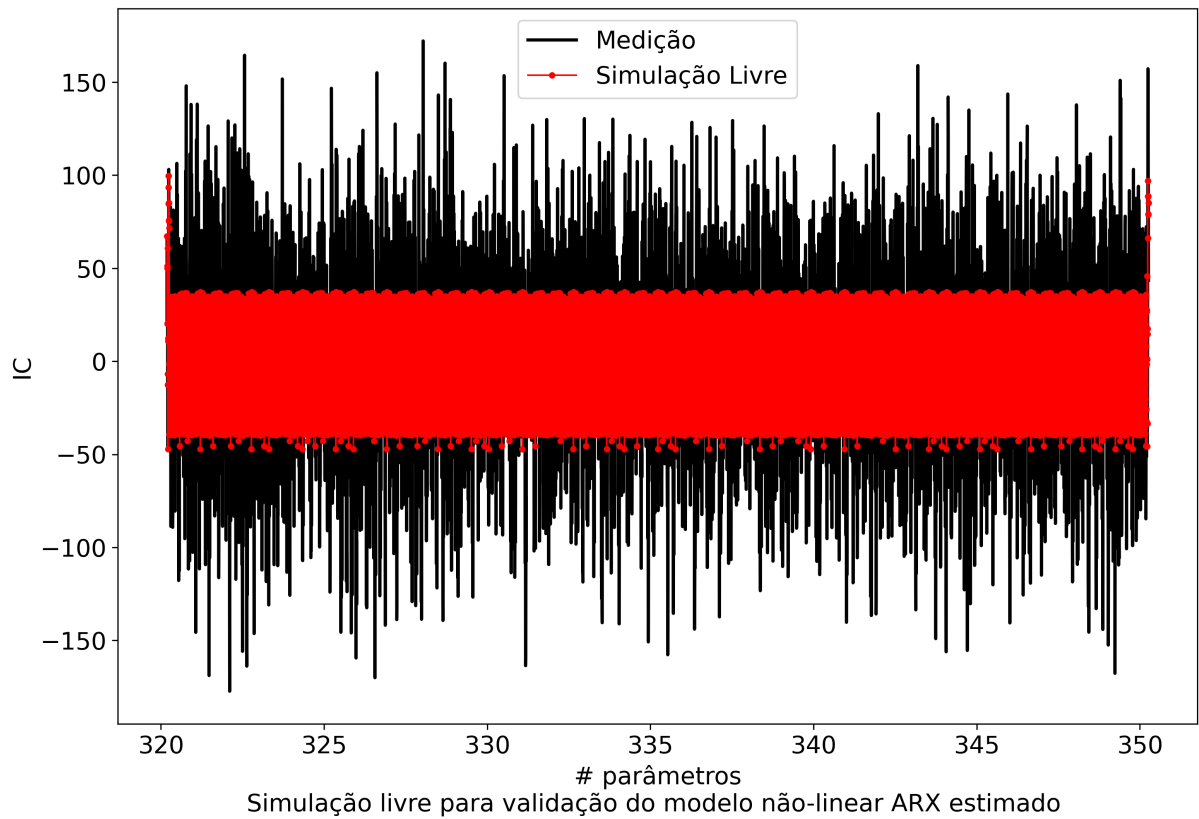


Figura 65 – Simulação Livre do Modelo NARX obtido.

4.3.6 Análise Espectral de Alta Ordem no Domínio do Tempo da Simulação Livre

A Figura 66 apresenta os espectros de alta ordem no domínio do tempo para o sinal coletado no colículo inferior, durante o primeiro evento sonoro da etapa de teste do protocolo de condicionamento auditivo de medo.

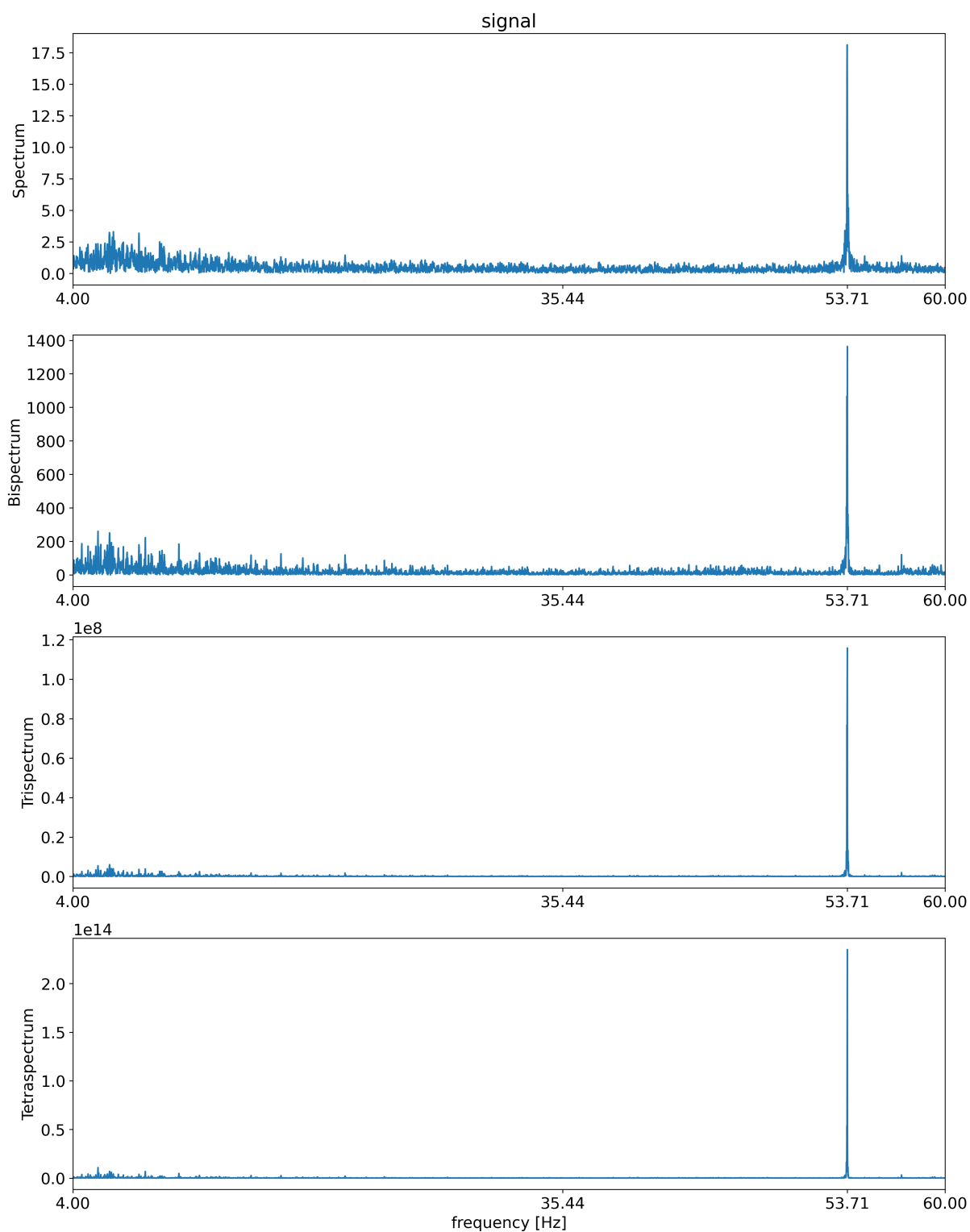


Figura 66 – Espectro, Bispectro, Trispectro e Quadr spectro para o evento sonoro 1 do sinal medido no colículo inferior.

Já a Figura 67 mostra os mesmos espectros da Figura 66, porém, para o sinal de saída da simulação livre do modelo NARX obtido.

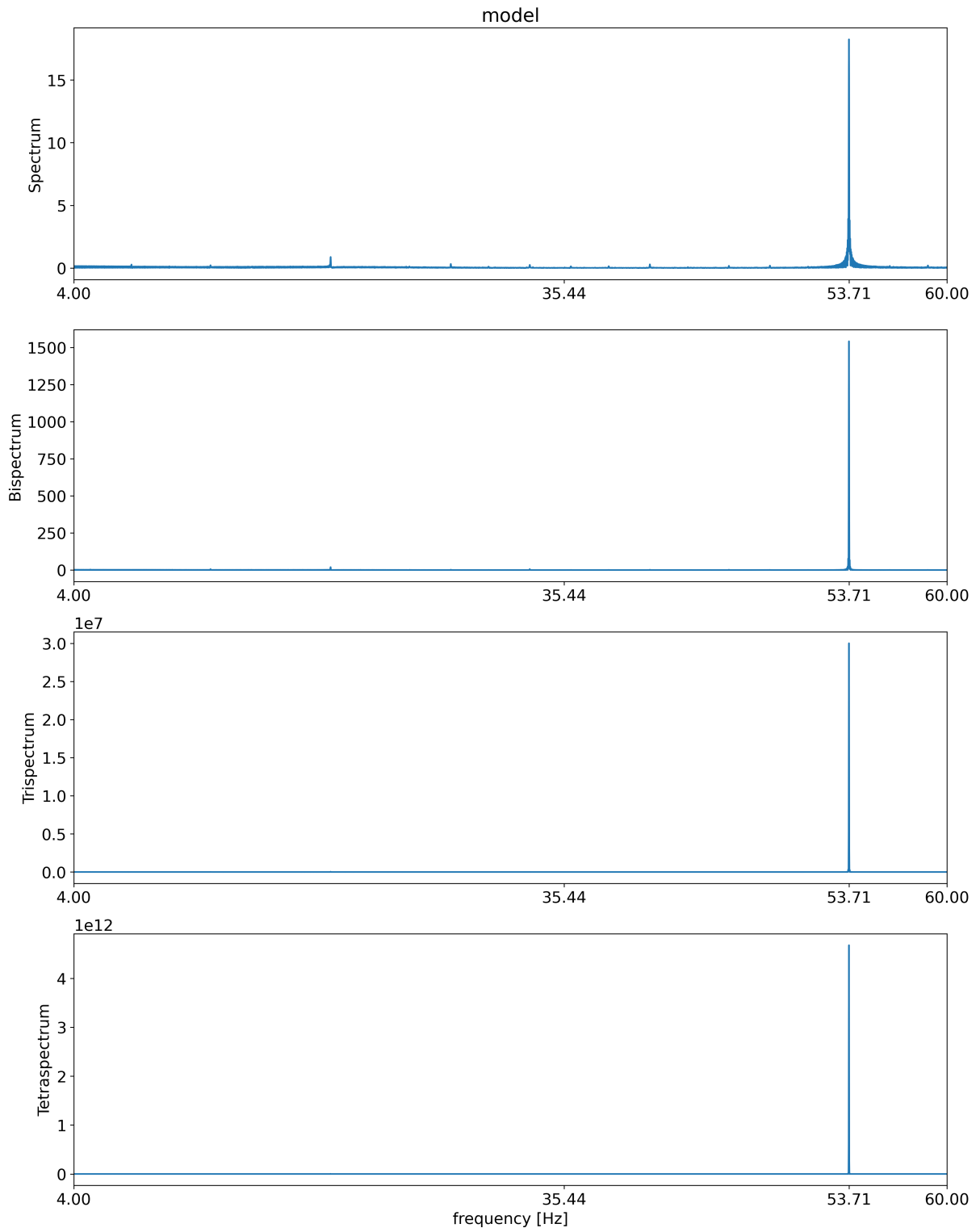


Figura 67 – Espectro, Bispectro, Trispectro e Quadrispectro para a simulação livre do modelo NARX.

Observando os espectros, bem como os resultados já apresentados na Seção 4.2 do Capítulo 4, é possível perceber que o sinal possui um perfil bimodal na frequência, tendo atividade relevante na banda θ e para o valor do estímulo sonoro do protocolo de aprendizado associativo. Analisando os espectros do sinal medido (Figura 66) e do modelo

(Figura 67), é possível perceber que a diferença dinâmica se encontra na banda θ , que o modelo não conseguiu reproduzir, uma vez que o espectro do sinal medido é bimodal e o espectro do sinal da validação livre do modelo é unimodal. Isso se dá pelo fato da componente em 53,71 Hz ser consideravelmente maior do que as demais componentes de frequência.

4.3.7 Considerações

A análise utilizando modelagem polinomial não-linear com modelos da família NARX foi parcialmente bem sucedida, uma vez que os modelos foram gerados com sucesso, embora os resultados obtidos não tenham sido úteis para as análises dinâmicas feitas neste trabalho. O motivo por trás da dificuldade em se obter modelos que tragam informações úteis é o fato do sinal possuir espectro bimodal e ruidoso, de modo que somente a componente de frequência relativa ao estímulo sonoro é bem modelada. No entanto, as técnicas e os passos utilizados para obter os resultados são válidos e funcionais, portanto, contribui-se com um guia de como se fazer a modelagem polinomial não-linear, um assunto abordado neste trabalho, mas que não foi utilizado para análises de resultados.

4.4 Considerações Finais

As técnicas utilizadas em [Simões et al. \[2020\]](#), replicadas na base de dados 1, foram reproduzidas com sucesso, permitindo identificar a alteração relativa a neuroplasticidade obtida após o protocolo de AFC. A técnica implementada neste trabalho, a TDHOSA, gerou resultados condizentes com a literatura (FFT, espectrograma, MPC, etc), além de trazer novas informações sobre os espectros de alta ordem, indicando a presença de não-linearidades relevantes no sinal, como o acoplamento de frequências, além de gerar resultados com ruído gaussiano suprimido. Essas características resultam em formas de onda mais suaves que as obtidas por técnicas clássicas, como a FFT.

As análises espectrais de alta ordem no domínio do tempo da base de dados 2, que se trata do potencial evocado coletado em vários substratos durante as etapas de habituação e teste do AFC, foram condizentes com o experimento feito em [Simões et al. \[2020\]](#) e com as análises reproduzidas, além de trazer resultados novos, como a presença da componente de frequência do estímulo sonoro em 53,71Hz em outros substratos, além do IC, embora de forma menos explícita. Além disso, é possível ver alterações na dinâmica desses substratos, na banda θ , após o AFC. Esse resultado indica que além do IC, é possível identificar e traçar o perfil das mudanças dinâmicas presente nos outros substratos cerebrais que compõem a via acústico límbica. Isso confirma a característica não-linear da mudança dinâmica resultante do AFC, de modo que os sinais possuem componentes relevantes para os espectros de alta ordem, onde essas frequências se acoplam com outras

frequências, embora tais acoplamentos sejam apenas detectados, mas não identificados. Vale notar que somente o espectro (*spectrum*) possui significado físico relevante, que é a energia do sinal no domínio da frequência, sendo esta equivalente à transformada de Fourier da função de autocorrelação do sinal. Além disso, por ter sido registrada utilizando diferentes equipamentos para a captura de dados, a base de dados 2 possui diferentes parâmetros se comparado com a base de dados 1, apresentada em [Simões et al. \[2020\]](#), resultando em diferentes amplitudes entre os espectros, que não devem ser comparados quantitativamente.

A análise do comportamento de congelamento, aplicada na etapa de teste da base de dados 2, mostrou que o animal apresentou consolidação da memória de medo, apresentando o comportamento de congelamento de forma consistente na etapa de teste após ouvir o estímulo auditivo condicionado, mesmo sem a presença do estímulo aversivo. Análises utilizando a TDHOSA nos 3 s antes e depois do início de três eventos de congelamento foram feitas para três eventos de congelamento, e para cada evento, a dinâmica na banda θ foi condizente com o comportamento apresentado pelo animal, de modo que os espectros durante a presença dos estímulos sonoros apresentaram um pico na frequência da moduladora do som. Na etapa de habituação não houve nenhum congelamento, mesmo durante os eventos sonoros, indicando neutralidade do som.

As técnicas de modelagem foram apresentadas e os modelos foram obtidos com sucesso, porém, as informações obtidas através do uso de modelos polinomiais não-lineares da família NARX não se mostraram úteis para a análise proposta, por não trazerem novidades para as análises já feitas, portanto, os resultados obtidos foram apresentados de forma breve, para ilustrar os resultados parciais e um dos modelos obtidos durante o processo de modelagem. A utilização de modelos mais complexos e refinados é uma opção de continuidade, bem como análises mais específicas e direcionada dos resultados dos modelos, utilizando inteligência artificial e aprendizado de máquina, para a extração de características.

Este trabalho reproduziu técnicas clássicas como a FFT, espectrograma e o MPC, para a análise de sinais eletrofisiológicos. A FFT apresenta um gráfico linear de fácil interpretação, onde o sinal é decomposto em componentes de frequência com limite baseado no teorema de Nyquist. A FFT traz informações sobre a distribuição de energia do sinal ao longo do espectro de frequências e permite fazer a reconstrução do sinal original apenas com os ganhos e frequências. O espectrograma é uma expansão da FFT, mostrando a decomposição do sinal em componentes de frequência ao longo do tempo, permitindo analisar mudanças dinâmicas ao longo do tempo, bem como comparar diferentes instantes de tempo apenas com um gráfico. O MPC indica o grau de sincronismo médio entre dois sinais, mesmo quando esse sincronismo é fraco e imperceptível, além dos resultados serem facilmente interpretados através dos gráficos polares que são gerados. A técnica

implementada, TDHOSA, foi utilizada em todas as etapas deste trabalho, sendo comparada com as técnicas clássicas na primeira etapa, processando a base de dados 1, publicada por [Simões et al. \[2020\]](#). Na segunda etapa, a base de dados 2 foi processada somente pelo TDHOSA, com foco na análise qualitativa dos espectros de alta ordem, do espectro até o quadrispectro, principalmente nas bandas θ e γ . Esta última, em torno da frequência de modulação do estímulo auditivo condicionado, 53,71 Hz. Na terceira etapa, modelos polinomiais não-lineares da família NARX foram ajustados, e a TDHOSA aplicada tanto nos sinais coletados quanto nos sinais simulados pelo modelo, com o objetivo de comparar a fidelidade da dinâmica do sinal simulado, se comparado com o a dinâmica do sinal coletado, olhando tanto para o espectro de potência quanto para os espectros de alta ordem.

O uso da FFT é fundamental para análises no domínio da frequência, por se tratar de um algoritmo bem estabelecido na literatura, além de ser computacionalmente barato. De fácil interpretação, a FFT é usada neste trabalho como um algoritmo de análise e um padrão para comparação da TDHOSA, uma vez que ambos fornecem gráficos com o eixo das abscissas sendo a frequência. A desvantagem da FFT em comparação com a TDHOSA, é que não é possível distinguir componentes de frequência relativas a não-linearidades do sinal em análise, além da susceptibilidade à ruído gaussiano.

O espectrograma, sendo uma renderização da Transformada de Fourier de Tempo Curto, fornece as mesmas informações que a FFT, porém ao longo do tempo. Essa diferença torna a técnica especialmente útil em análises onde se deseja observar comportamentos rápidos, ou comparar a dinâmica de um sistema ao longo do tempo. A técnica também é útil para a análise de sistemas cujas características espectrais varia ao longo do tempo, permitindo visualizar essa variação. A desvantagem do espectrograma é que se trata de uma técnica cujo desempenho está diretamente ligado à parametrização, e pequenas alterações nesses parâmetros pode mascarar ou esconder informações importantes, impedindo uma análise adequada da dinâmica do sinal analisado. Uma das dificuldades é a de se analisar informações que se manifestam com baixa amplitude na frequência, uma vez que a análise visual de um gráfico tridimensional tende a ser mais difícil do que a de um gráfico bidimensional como a FFT e a TDHOSA.

O MPC é uma técnica com o objetivo direto: identificar e quantificar sincronismos de fase. A técnica cumpre seu papel, permitindo a identificação e quantificação dos sincronismos de fases. Uma das desvantagens é a necessidade de se filtrar o sinal, além da técnica não fornecer um limiar para determinar se determinado MPC pode ou não ser considerado sincronismo, deixando margem para uma análise subjetiva. A técnica consiste apenas de um valor médio de sincronismo e de fase média, porém, para facilitar a visualização, os valores de fase instantânea de fase são plotados no círculo polar, bem como o vetor correspondente ao MPC, facilitando a interpretação dos resultados através

da análise visual. Para o AFC, a técnica possui um significado físico claro: o sinal periódico da moduladora da onda sonora escutada pelo animal possui um sincronismo de amplitude igual ao MPC em relação ao sinal periódico do potencial evocado no substrato cerebral em estudo, no caso, o IC.

A TDHOSA é uma ferramenta de análise espectral utilizada em processamento de sinais e análise estatística. Trata-se de uma extensão do espectro de potência, que é usado para analisar a distribuição de energia em diferentes frequências em um sinal. Enquanto o espectro de potência fornece informações sobre a intensidade das diferentes frequências em um sinal, a TDHOSA vai além, analisando interações não lineares entre diferentes componentes de frequência do sinal. Em outras palavras, a TDHOSA é usada para identificar relações não lineares entre frequências presentes em um sinal. Enquanto o bispectro se concentra em revelar relações não lineares entre componentes de frequência em um sinal, o trispectro vai um passo adiante, buscando identificar relações trinárias entre essas componentes de frequência. Ou seja, o trispectro é uma ferramenta matemática usada para detectar interações não lineares de terceira ordem em sinais. O quadrispectro é uma extensão do trispectro para interações de quarta ordem, e assim por diante. O uso da TDHOSA é útil em situações em que as interações entre múltiplas componentes de frequência em um sinal são de interesse, como em análises avançadas de sistemas complexos e não lineares.

Nas três etapas, a TDHOSA se mostrou uma técnica de fácil análise se comparado com a versão clássica, HOSA, que é multidimensional e multi-simétrica, a partir do bispectro, apresentando as informações dinâmicas de forma consistente entre todos os espectros, ou seja, um gráfico unilateral e bidimensional, sendo uma representação visual de uma função que mapeia uma frequência à uma amplitude. A presença de quatro espectros para cada sinal analisado, se comparado com apenas um gráfico resultante pela FFT, permite uma análise mais detalhada e robusta, uma vez que cada espectro possui um significado distinto, e do bispectro para cima, as informações são por definição não-lineares. Portanto, recomenda-se o uso da TDHOSA para análise de sinais ou sistemas de natureza não-linear, além da propriedade de robustez à ruídos gaussianos, que suaviza o sinal e destaca as frequências relevantes de frequências com componentes ruidosas e espúrias do sinal. Um exemplo é a frequência da moduladora do estímulo sonoro durante o AFC, que em ambas as bases de dados, bem como no modelo NARX, apareceu de forma evidente e relevante em todos os espectros, para os sinais coletados no colículo inferior.

Por fim, os resultados mostram que a TDHOSA é uma técnica consistente e de fácil interpretação, que apresenta as informações dinâmicas relevantes de maneira interpretável sem tratamento prévio e posterior do sinal. A TDHOSA aplicada na base de dados 2 também mostrou que há um sincronismo de todos os substratos cerebrais da via acústico-límbica na etapa de teste, tanto na banda θ quanto na frequência da moduladora,

53,71 Hz, quando o estímulo condicionado é apresentado ao animal, após a tarefa de aprendizado associativo.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram apresentados os fundamentos matemáticos das técnicas de análise: FFT, Espectrograma, MPC e TDHOSA. Os resultados indicam que todas as técnicas foram eficazes na identificação de alterações na rede neural após a tarefa de memória associativa. As quatro técnicas foram utilizadas para validação dos resultados publicados por [Simões et al. \[2020\]](#), onde os espectros de alta ordem foram significativos, indicando acoplamentos entre a frequência de modulação do estímulo sonoro e outras frequências harmônicas. A TDHOSA também foi usada para analisar a base de dados 2, e os resultados relativos ao colículo inferior reforçam aqueles obtidos em [Simões et al. \[2020\]](#) e [Lockmann et al. \[2017\]](#), além de trazer novidades, como a identificação de mudanças na dinâmica neural dos substratos da via acústico límbica, nos complexos lateral e basolateral da amígdala e nos substratos pré-límbico e infra-límbico do córtex pré-frontal medial. Também foi feita uma modelagem da base de dados 2, utilizando modelos NARX e diferentes combinações de grau máximo e atrasos máximos na seleção de regressores, tendo um canal do IC como saída e os demais canais como possíveis entradas. Os modelos não obtiveram sucesso em modelar a dinâmica bimodal dos espectros, uma vez que somente a dinâmica em 53,71 Hz foi modelada adequadamente, e a dinâmica em θ não foi bem representada pelo modelo.

A utilização da TDHOSA no cálculo dos espectros de alta ordem gera espectros com formas de onda com menor presença de artefatos espúrios, o que indica maior robustez frente a ruído gaussiano e resulta em maior fidelidade do sinal. Conclui-se que a TDHOSA traz novidades para a análise, fornecendo informações sobre não-linearidades e acoplamentos entre frequências, porém, nenhuma técnica se mostrou redundante perante as demais, portanto, recomenda-se a utilização das mesmas em conjunto na análise de dados neurofisiológicos.

Os resultados deste trabalho podem ser expandidos para a identificação das frequências harmônicas de acoplamento, a utilização de aprendizado de máquina e inteligência artificial para extração de características e informações contidas no sinal coletado e nos espectros de alta ordem no domínio do tempo, utilizando as técnicas como fonte de variáveis independentes. Os resultados da modelagem podem ser expandidos adotando uma abordagem diferente na seleção da saída para o modelo, bem como a utilização de modelos mais complexos e o uso de diferentes ferramentas para a seleção de regressores. Por fim, embora otimizações tenha sido feitas nesse trabalho, a TDHOSA apresentou um desempenho computacional com margem para melhorias, que tornariam a técnica mais eficiente para o uso em bases de dados grandes. Recomenda-se a implementação em linguagens de baixo nível compiladas, bem como uma análise matemática para estudar a

possibilidade de simplificação no algoritmo que calcula a TDHOSA.

Referências

- E. Adrian. *The Basis of Sensation: The Action of the Sense Organs*. O-P books. Christophers, 1928. ISBN 9780598969668. URL <https://books.google.com.br/books?id=w1VKAAAAIAAJ>.
- L. Aguirre. *Introdução à Identificação de Sistemas*. Editora UFMG, 01 2015. ISBN 978-85-423-0079-6. doi: 10.13140/RG.2.1.1616.7925.
- L. Aguirre. *Sistemas dinâmicos não lineares: Conceitos e análise de dados*, 03 2022.
- P. A. Amaral-Júnior, F. A. G. Mourão, M. C. L. Amancio, H. P. P. Pinto, V. R. Carvalho, L. d. O. Guarnieri, H. A. Magalhães, and M. F. D. Moraes. A custom microcontrolled and wireless-operated chamber for auditory fear conditioning. *Frontiers in neuroscience*, page 1193, 2019.
- M. V. R. Anjos. high-order-spectral-analysis, 2023a. URL https://github.com/matheusvra/high_order_spectra_analysis.
- M. V. R. Anjos. time-domain-high-order-spectral-analysis-python, 2023b. URL https://github.com/matheusvra/time_domain_high_order_spectral_analysis_python.
- V. M. Bajo and A. J. King. Cortical modulation of auditory processing in the midbrain. *Frontiers in neural circuits*, 6:114, 2013.
- V. M. Bajo, F. R. Nodal, D. R. Moore, and A. J. King. The descending corticocollicular pathway mediates learning-induced auditory plasticity. *Nature neuroscience*, 13(2): 253–260, 2010.
- A. Bechara, D. Tranel, and H. Damasio. Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. *Brain*, 123(11):2189–2202, 2000.
- S. J. Bensmaia, P. V. Denchev, J. F. Dammann, J. C. Craig, and S. S. Hsiao. The representation of stimulus orientation in the early stages of somatosensory processing. *Journal of Neuroscience*, 28(3):776–786, 2008.
- S. Chen, Z. Tan, W. Xia, C. A. Gomes, X. Zhang, W. Zhou, S. Liang, N. Axmacher, and L. Wang. Theta oscillations synchronize human medial prefrontal cortex and amygdala during fear learning. *Science Advances*, 7(34):eabf4198, 2021. doi: 10.1126/sciadv.abf4198. URL <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sciadv.abf4198>.
- B. M. Clopton and J. A. Winfield. Tonotopic organization in the inferior colliculus of the rat. *Brain research*, 1973.

- M. X. Cohen. *Analyzing Neural Time Series Data: Theory and Practice*. The MIT Press, 01 2014. ISBN 9780262319553. doi: 10.7551/mitpress/9609.001.0001. URL <https://doi.org/10.7551/mitpress/9609.001.0001>.
- P. Curzon, N. Rustay, and K. Browman. Cued and contextual fear conditioning for rodents. *Methods of Behavioral Analysis in Neuroscience*, 01 2009. doi: 10.1201/NOE1420052343.ch2.
- A. K. Engel, P. Fries, and W. Singer. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10):704–716, 2001.
- L. B. Felix, J. E. Moraes, H. C. Yehia, M. F. D. Moraes, et al. Avoiding spectral leakage in objective detection of auditory steady-state evoked responses in the inferior colliculus of rat using coherence. *Journal of neuroscience methods*, 144(2):249–255, 2005.
- J. Fell and N. Axmacher. The role of phase synchronization in memory processes, 2 2011. ISSN 1471003X.
- A. Furtado Boreli. Extração de Características em Sinais Biológicos Utilizando Estatística de Alta Ordem. Master’s thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- O. Herreras. Local field potentials: Myths and misunderstandings. *Frontiers in Neural Circuits*, 10, 2016. ISSN 1662-5110. doi: 10.3389/fncir.2016.00101. URL <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2016.00101>.
- M. Johansson. The hilbert transform. *Mathematics Master’s Thesis*. Växjö University, Suecia. Disponível en internet: http://w3.msi.vxu.se/exarb/mj_ex.pdf, consultado el, 19, 1999.
- P. Joris, C. Schreiner, and A. Rees. Neural processing of amplitude-modulated sounds. *Physiological reviews*, 84:541–77, 05 2004. doi: 10.1152/physrev.00029.2003.
- N. Karalis, C. Dejean, F. Chaudun, S. Khoder, R. R. Rozeske, H. Wurtz, S. Bagur, K. Benchenane, A. Sirota, J. Courtin, et al. 4-hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. *Nature neuroscience*, 19(4):605–612, 2016.
- J. J. Kim and M. W. Jung. Neural circuits and mechanisms involved in pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 30(2):188–202, 2006.
- J.-P. Lachaux, E. Rodriguez, J. Martinerie, and F. J. Varela. Measuring phase synchrony in brain signals. *Human brain mapping*, 8(4):194–208, 1999.
- C. Lainscsek and T. J. Sejnowski. Delay differential analysis of time series. *Neural Computation*, 27(3), 2015. ISSN 1530888X. doi: 10.1162/NECO_a_00706.

- G. Laurent, M. Wehr, and H. Davidowitz. Temporal representations of odors in an olfactory network. *Journal of Neuroscience*, 16(12):3837–3847, 1996.
- J. E. Ledoux, D. A. Ruggiero, R. Forest, R. Stornetta, and D. J. Reis. Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 264(1):123–146, 1987.
- E. Likhtik, J. M. Stujenske, M. A. Topiwala, A. Z. Harris, and J. A. Gordon. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. *Nature neuroscience*, 17(1):106–113, 2014.
- A. L. V. Lockmann, F. A. G. Mourão, and M. F. D. Moraes. Auditory fear conditioning modifies steady-state evoked potentials in the rat inferior colliculus. *J Neurophysiol*, 118:1012–1020, 2017. doi: 10.1152/jn.00293.2017. URL www.jn.org.
- R. A. Marsh, Z. M. Fuzessery, C. D. Grose, and J. J. Wenstrup. Projection to the inferior colliculus from the basal nucleus of the amygdala. *Journal of Neuroscience*, 22(23):10449–10460, 2002.
- M. M. McKerns, L. Strand, T. Sullivan, A. Fang, and M. A. Aivazis. Building a framework for predictive science. *arXiv preprint arXiv:1202.1056*, 2012.
- H. Meeren, A. V. C. Van Walsum, E. Van Luijtelaar, and A. Coenen. Auditory evoked potentials from auditory cortex, medial geniculate nucleus, and inferior colliculus during sleep–wake states and spike-wave discharges in the wag/rij rat. *Brain research*, 898(2):321–331, 2001.
- F. A. G. Mourão, L. d. O. Guarnieri, P. A. Amaral Júnior, V. R. Carvalho, E. M. A. M. Mendes, and M. F. D. Moraes. A fully adapted headstage with custom electrode arrays designed for electrophysiological experiments. *Frontiers in neuroscience*, 15:691788, 2022.
- C. Nikias and M. Raghuveer. Bispectrum estimation: A digital signal processing framework. *Proceedings of the IEEE*, 75(7):869–891, 1987. ISSN 0018-9219. doi: 10.1109/PROC.1987.13824.
- A. V. Oppenheim. Speech spectrograms using the fast fourier transform. *IEEE spectrum*, 7(8):57–62, 1970.
- A. V. Oppenheim, A. S. Willsky, S. H. Nawab, and J.-J. Ding. *Signals and systems*, volume 2. Prentice hall Upper Saddle River, NJ, 1997.
- G. Paxinos and C. Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6p th p ed, 2007.
- G. J. Quirk, R. Garcia, and F. González-Lima. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biological psychiatry*, 60(4):337–343, 2006.

- A. Rees, G. Green, and R. Kay. Steady-state evoked responses to sinusoidally amplitude-modulated sounds recorded in man. *Hearing research*, 23(2):123–133, 1986.
- M. T. Rogan and J. E. LeDoux. Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. *Cell*, 85(4):469–475, 1996.
- M. T. Rogan, U. V. Stäubli, and J. E. LeDoux. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390(6660):604–607, 1997.
- M. S. Fanselow. What is conditioned fear? *Trends in Neurosciences*, 7(12):460–462, 1984. ISSN 0166-2236. doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(84\)80253-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(84)80253-2). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223684802532>.
- R. Scheffer-Teixeira and A. B. L. Tort. Theta-Gamma Cross-Frequency Analyses (Hippocampus). In *Encyclopedia of Computational Neuroscience*, pages 1–15. Springer New York, 2018. doi: 10.1007/978-1-4614-7320-6{_}100658-1.
- B. Sharp. Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction. *Translational psychiatry*, 7(8):e1194–e1194, 2017.
- D. L. Sherman, C. B. Patel, N. Zhang, L. A. Rossell, Y. C. Tsai, N. V. Thakor, and M. A. Mirski. Sinusoidal modeling of ictal activity along a thalamus-to-cortex seizure pathway i: new coherence approaches. *Annals of biomedical engineering*, 32:1252–1264, 2004.
- J. H. Siegle, A. C. López, Y. A. Patel, K. Abramov, S. Ohayon, and J. Voigts. Open ephys: an open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology. *Journal of neural engineering*, 14(4):045003, 2017.
- J. C. Sigl and N. G. Chamoun. An introduction to bispectral analysis for the electroencephalogram. *Journal of clinical monitoring*, 10:392–404, 1994.
- C. S. Simões, F. A. G. Mourão, L. O. Guarnieri, M. C. Passos, and M. F. Moraes. Amygdala inhibition impairs fear conditioning but increases the stimulus-driven activity in the inferior colliculus. *Neuroscience letters*, 738:135311, 2020.
- R. B. Stein, E. R. Gossen, and K. E. Jones. Neuronal variability: noise or part of the signal? *Nature Reviews Neuroscience*, 6(5):389–397, 2005.
- J. M. Stujenske, E. Likhtik, M. A. Topiwala, and J. A. Gordon. Fear and safety engage competing patterns of theta-gamma coupling in the basolateral amygdala. *Neuron*, 83(4):919–933, 2014. ISSN 0896-6273. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.026>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627314006370>.
- J. B. Watson and R. Rayner. Conditioned emotional reactions. *Journal of experimental psychology*, 3(1):1, 1920.

J. A. Winer, M. L. Chernock, D. T. Larue, and S. W. Cheung. Descending projections to the inferior colliculus from the posterior thalamus and the auditory cortex in rat, cat, and monkey. *Hearing research*, 168(1-2):181–195, 2002.