Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Flávio Afonso Gonçalves Mourão

COMUNICAÇÃO SERIAL ASSÍNCRONA COM O CÉREBRO:

Padrões temporais de microestimulação elétrica ditando o comportamento

Belo Horizonte

2014

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Flávio Afonso Gonçalves Mourão

COMUNICAÇÃO SERIAL ASSÍNCRONA COM O CÉREBRO:
Padrões temporais de microestimulação elétrica ditando o comportamento

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor

Orientador: Prof. Márcio Flávio Dutra Moraes
Coorientador: Prof. André Ricardo Massensini

Belo Horizonte
2014

043 Mourão, Flávio Afonso Gonçalves.
Comunicação serial assíncrona com o cérebro : padrões temporais de microestimulação elétrica ditando o comportamento [manuscrito] / Flávio Afonso Gonçalves Mourão. – 2014.

136 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Márcio Flávio Dutra Moraes. Co-orientador: André Ricardo Massensini.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Cérebro – Estimulo - Teses. 2. Estimulação elétrica – Teses. 3. Complexo amigdalóide. 4. Medo – Condicionamento – Teses. 5. Córtex Pré-frontal – Teses. 6. Codificação temporal. 7. Fisiologia – Teses. I. Moraes, Márcio Flávio Dutra. II. Massensini, André Ricardo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Neurociências (NNC) do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Bloco A4 sala 168/240, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com auxílio das seguintes agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- Pró-Reitoria de Pesquisa UFMG – PRPq/UFMG

Aos meus Pais, meu Irmão
e à Lídia, meu Benzinho

AGRADECIMENTOS

Quase todos os dias pela manhã fui o primeiro a chegar. Como todo pós graduando existe uma certa glória nefasta em assumir e se gabar pelas longas horas despendidas no laboratório. Apesar disso, admito, o trabalho de bancada sempre começou mais tarde.

Depois de uma carona com benzinho, ou depois de uma volta de bicicleta, as 6:30 a água sempre começava a ferver. Passava meu café e, após alguns minutos, com a xícara bem cheia, eu sentava com o meu cigarro aceso em algum final de corredor, na maioria das vezes na copa do departamento.

"Somos aquilo que recordamos...e também somos o que resolvemos esquecer"
I. Izquierdo

Assim começava meu dia. Com música nos fones, conversando sozinho, lembrando e confabulando.
Senti saudades de momentos que não tive. Pensei a todo momento nos meus pais, em seu esforço por me trazer até aqui, na coragem do meu irmão, na vida dos meus avós e do restante da família.
Pensei muito em pessoas amadas que se foram.

Chorei saudades dos meus cachorros e outros companheiros de estimação.

Destilei ódio/amor a pessoas, algumas que nem existiam.

Rascunhei letras para o Possuídos. Joguei fora quase todos os rascunhos.
Senti muita falta dos meus amigos. Ansiei pelos ensaios nas sextas à noite ou nos sábados pela manhã.

Vasculhei o passado. Como sempre.

"*Volta benzinho, você voa!*"
A Lídia sempre me chamando, guiando minha aterrissagem.
Ela segura na minha mão e se esforça para entender. O que nem eu mesmo entendo.
Te amo meu bem. Muito obrigado.
Você me acalma, me incentiva. Você faz parte de mim.
Até o fim. Se houver um.
Falar sobre incentivo? ... Cheio de altruísmo! Obrigado Moema pelo apoio constante desde as minhas primeiras tentativas na UFMG e Karen por sempre agitar sorrisos e se lembrar de mim.

Ao longo de todo esse tempo, por volta das 7:00, o Zezé era o primeiro a chegar. Técnico com mais de 40 anos de ICB, o mais responsável e dedicado. Chegava e também fazia café. Fazia 4 litros para todos do departamento e não pedia nada em troca. Sentado enquanto a água fervia, ao som de um ebulidor, passava vários minutos se lembrando e contando sobre cada rosto que conheceu por aqueles corredores. Foram muitos os casos a respeito de artérias canuladas, para muitos alunos que nem sequer agradeciam.
Obrigado pela companhia meu amigo. Você merece muito mais que um mero agradecimento.
Mais tarde, o café se completava com a Betinha e o biscoito amanteigado. Junto com a presença do Lucas.... - meu velho, além do bolo de padaria, obrigado por toda a força.

Um erro seria não se lembrar da Cintya. Elétrica, de prontidão e com uma presença de espírito "ácido"! Antes mesmo de mim e do Zezé, a sua água já fervia. Café com pão de forma e queijo. A secretaria ao som da Itatiaia. Muito obrigado pelas mais que sinceras risadas e pela ajuda quando consegui a bolsa REUNI.

Assim o tempo seguiu. Em dias e meses diferentes.

Uma ode aos amigos: Gabriel Perfeito, André Lockmann e Cristiano Simões.
Cada um em seu momento. Ambos conhecem bem a beleza do pouco convencional, do submundo, da cerveja barata, da música, do centro da cidade, da literatura e do cinema. A parte que quase ninguém acompanha ou gosta.

Gabriel, titio, poupo palavras para não exagerar. Mas você já sabe. Infelizmente o tempo passou e levou você de volta para casa. Sinto muito sua falta. Continue olhando para as estrelas. E obrigado pela mão certeira, no apoio ao condicionamento ao medo e por me ensinar sobre esse triangulo tão complexo chamado amígdala.

Lockmito, você nasceu do avesso. E assim como o Geraldo Viramundo foi conhecer outras paragens. Sua amizade e lealdade, quando tive dificuldade com os experimentos, foram responsáveis por tudo terminar bem. Obrigado. Dedico a você mais uma cerveja gelada, ao som de *Kind of Blue*.

E Simões...demorou para chegar, mas... quando todos haviam ido embora, quando um grande silêncio havia sido instaurado e não havia mais ninguém para dividir gostos estranhos, você felizmente surgiu, preenchendo o lugar com muita harmonia e música. Nick Cave quem o diga! Fora que o Bowie está muito bem guardado. E prometo. Para sempre preservado. Como espero preservar sempre sua amizade.

7:30 ...”ah...cheiro de café!!” frase que se repetia e ainda se repete todos os dias...por Daniel Cabronzito...
Meu Amigo a 7 anos, filho único, meu completo oposto. Construímos um castelo sólido, incapaz de desabar mesmo em um chão arenoso. Sempre acreditei e continuo acreditando, ainda mais depois de todo esse tempo, que o medo reflexo pela contingência aversiva - ou a ansiedade no labirinto aberto e muito elevado - não vale a corrida contra o tempo perdido. Ou a competição. Ainda mais quando ela nunca existiu. Como convenço a todos disso? Não importa. Que se mantenha o silêncio. Mas afirmo que junto aos graves erros de interpretação em nossas histórias, sempre me dei por vencido as sádicas discussões e principalmente a voz exaltada. Vejo o seu mérito, como um grande ser humano, muito além de um bom argumento. Você já me venceu por W.O. e continua vencendo pelo grande amor fraterno que sinto por você. Obrigado meu grande Amigo. Por estar comigo.

Marina e Luciana. Parte de uma família que conheci depois de velho.

Marina, minha irmã mais nova. Perspicaz, adulta. Que me remete(u) grandes preocupações. Paguei preços exorbitantes por isso!! Tudo bem, culpa minha. Mas estou tranquilo. Sei que sua trilha sempre esteve pronta e será repleta de felicidade.

Lu...minha filha sem laços sanguíneos. Um caso de sensibilidade tão extrema que todos confundem com loucura. Que me mata de raiva. Que me faz respirar fundo. Mas ao mesmo tempo me mata de rir, tornando minha vida leve quando me grita desesperada, chorando em meio a longos volumes de catarro... em sufocos horrendos, com câmeras, tomadas, estatística, cadeiras, mesas, paquímetro, estufas, autoclaves e qualquer coisa que teoricamente não está funcionando. Adoro seu cabelo cheio de acrílico!!

Tupetchxxi e Pedrão. Como vocês dois fazem falta!
Vocês foram responsáveis por grande parte do que consegui construir. Conviver com vocês tornou meu ambiente leve.
Pedrão...obrigado pelo capacete de bicicleta e pela meia garrafa, já bebida, de *Whisky* desconhecido ao final da defesa.

Laio e Julio. Espero que um dia vocês retornem a ciência de bancada.
Júlio, que você e a Roberta sejam muito felizes !!
E Laio meu velho, sua amizade está guardada. Os latões de FAXE ainda seguram meus livros na estante!

8:00 *"Mais um café Mestre?*"

Repeti isso inúmeras vezes. Até com riqueza detalhes. Você, Mestre, me surpreendeu desde o primeiro encontro. De filosofias a lições de vida. Você é um anarquista nato, um educador, humano e social, em meio a republicanos armados.
Frequentamos a varanda do departamento e furtivamente a escada para o telhado, para se esconder e discutir ciência. E do café a cerveja você não só me orientou. Foi meu Amigo. Meu grande Amigo.
Comprei todas as suas ideias e ansiedades. Que não foram poucas. E tentei sempre fazer o melhor. De ideias que nos foram tiradas pelo poder, após dois anos de doutorado, zerando nosso contador, a ideias que deram muito certo e concluíram essa trajetória. Construímos, pensamos e dedicamos juntos. Madrugadas, domingos e feriados. Queimei muito meus dedos com solda quente nos finais de semana, sofri em frente a uma *protoboard*, ao osciloscópio e passei noites sem dormir olhando para os seus rabiscos, que por sinal, ainda estão colados na parede do meu quarto. Como já te disse, meu maior medo foi te frustrar.
Você, foi saudado pela vida por um presente maior. Que poucos compreendem. Você consegue ver o mundo de forma dinâmica, não suporta injustiças, hipocrisias e hipóteses não falseáveis. Você faz o que poucos fazem, uma engenharia biológica em constante quebra de paradigma.
E que o paradigma continue sendo quebrado, mesmo por uma vírgula que corte a frase, em uma nova regra gramatical. Que ninguém veja diretamente. Mas que preencha e mude o errôneo sentido do texto, ou melhor dizendo...do código do tempo.
Continuarei junto. Serei eternamente grato por ter me aceitado como aluno e o terei como meu amigo. Serei fiel a você e a sua família. Pedro, Luciano, Giovana, Grace, Dona Maria e Seu Tasso. Não importa o contexto.

Falando na sua família, penso fortemente em Pedro e Grace. Como todo texto de agradecimento acho que seria perfeito, mas muito clichê separa-los, rasgando elogios a cada um. Falar do Pedro nos shows de *hardcore* e elogiar o profissionalismo da Grace seria óbvio demais...enfim. Ambos são muito importantes para mim.

Pedro, sua sensibilidade exaltada é uma característica de poucos. Seu futuro é belo e brilhante. E Grace, você é tão sensível quanto o Pedro ... ou bem mais. Camufla-se em energia, mas afoga-se diariamente em lágrimas. Obrigado. Por tudo que você foi e continuará sendo, como exemplo para minha vida e minha carreira.

Aos outros professores, primeiro Professor André. Meu coorientador. Há 7 anos você me abriu as portas do laboratório. Sem ao menos me conhecer. E permitiu que eu fizesse Ciência. Obrigado por ceder a troca de orientação e pela chance de crescer profissionalmente como cientista e futuro educador.

Prof. Bruno...tem quando tempo que você entrou no laboratório? Foi ontem...e parece que te conheço a anos. Ainda temos muito o que fazer, conversar e trocar. Filmes cabulosos e chorosos!!
"*Até mais, e Obrigado pelos Peixes!*" (Sempre quis fazer esse trocadilho)

Prof. Juliana, sempre carinhosa. Tão distante, mas atenciosa. Obrigado pela carta de recomendação para o ingresso ao doutorado.

Professor Almir. Obrigado. Mesmo em outro campo do conhecimento o senhor acreditou em mim. Sempre me apoiou com palavras de conforto, um sorriso no rosto, uma xícara de café e música para dividir.

Professor Christopher, 4 anos como REUNI e 4 anos dividindo sua disciplina de biofísica.
Obrigado por todas as oportunidades, pela chance que você me ofereceu no final do curso e claro... pelas cervejas que ganhei de presente!

Thomazito, uma pena que sua estada foi curta. Mas seu sucesso é garantido junto com os Hermanos. Que pipoquem inúmeros novos neurônios!

Hyorrana...segura a ansiedade! Vai dar tudo certo.
Ainda vou te atormentar muito com músicas estranhas.

Taquinho, seu cruzeirense bola murcha!! Desejo toda felicidade para a sua vida. Obrigado pelo sincero companheirismo.

Hércules, meu leal amigo do mestrado. Que me fez rir por demais! Que muito rápido partiu. Mas direto para uma carreira de sucesso.

Mauro. Sempre pela direita da vida. Como convencê-lo de que não precisamos da direita ou da esquerda para escrever nosso caminho? Desisti. Na verdade acho que nunca tentei. Te respeito muito meu amigo e sinto sua falta. Conheci de perto a dificuldade da sua trilha, mas tenho certeza e com provas vivas que por onde você passa você deixa uma marca. E essa marca ajuda muita gente. Como me ajudou.

8:30...a todos os outros amigos que ainda chegam... Aos outros que já se foram. E não foram poucos.

“And manifest the daydream
Like those who failed before
And glorify our small attempts
And hate ourselves no more”

A Silver Mt. Zion – Horses in the Sky

Pampulha. 28-05-14 ~6AM.

RESUMO

A Microestimulação Elétrica (μES) em áreas sensoriais primárias tem sido utilizada como uma promissora técnica de "transferência" de informações para o cérebro. Em termos gerais, a percepção de um estímulo sensorial tem sido mimetizada através de eletrodos posicionados em áreas caracteristicamente monomodais, onde a intensidade do estímulo é determinada pela magnitude da frequência de μES aplicada. Neste contexto, uma possibilidade ainda não explorada é a de que um único eletrodo, como uma porta de comunicação serial assíncrona com o cérebro, aplique diferentes padrões temporalmente codificados de μES para desencadear o surgimento de diferentes estados cerebrais. Desta maneira, este trabalho testa a hipótese de que padrões temporais de μES são capazes de carrear diferentes informações, quando aplicados em uma área associativa polimodal como o Complexo Amigdaloide. Em outras palavras, se duas sequências binárias, compostas pelo mesmo número de bits iguais a 0 ou 1, forem aplicadas no Complexo Amigdaloide, elas poderiam ser associadas a diferentes valências ambientais? Ratos Wistar, machos (250 – 310 g), foram submetidos a um implante cirúrgico de eletrodos de μES no complexo basolateral da amígdala. Em seguida, foram submetidos a dois protocolos de condicionamento ao medo, com o pareamento de distintos padrões de μES, como estímulos condicionados (CS, pulso quadrados, bifásicos, 25 μA, λ de 100 μs), a um estímulo não condicionado (US, choque nas patas, 0,4 mA, durante 2 s). A resposta condicionada foi avaliada através de medidas do comportamento de congelamento (*freezing*, ausência de movimentos, exceto pela respiração, por 3 s). No primeiro protocolo foi utilizado um padrão periódico de 6 Hz de μES (166,7 ms de intervalo interpulso, IPI) como CS. A resposta de congelamento foi significativamente maior no grupo pareado (69 ± 5%) quando comparado com o grupo não pareado (25 ± 8%, $p < 0,001$). No segundo protocolo foram utilizados dois padrões temporais de μES, ambos com seis pulsos por segundo: (A) 1110000111 e (B) 1001111001, com 10 ms IPI. Durante a fase de condicionamento, todos os animais foram estimulados conforme os seguintes grupos: 1) Pareado A e Não Pareado B; 2) Pareado B e Não Pareado A e 3) Não Pareado A e Não Pareado B. O comportamento condicionado foi avaliado durante 3 dias consecutivos, utilizando apenas um padrão μES por dia; respectivamente, padrão B - A - B. A resposta condicionada foi observada no dia 1 apenas para o grupo Pareado B (Pareado B: 49 ± 7%; Pareado A: 22 ± 5%, $p < 0,05$; Não pareado: 13 ± 4%, $p < 0,001$). No dia 2, apenas o grupo Pareado A apresentou um comportamento condicionado significativo (Pareado B: 10 ± 2%; Pareado A: 49 ± 12%, $p < 0,001$; Não Pareado: 8 ± 2%, $p < 0,001$). No dia 3, os resultados foram semelhantes ao dia 1 (Pareado B: 42 ± 8%; Pareado A: 27 ± 10%, p = ns; Não pareado: 14 ± 3%, $p < 0,01$). A fim de determinar os substratos neurais recrutadas pelos diferentes padrões de estimulação, a expressão de *c-Fos* foi avaliada 90 minutos após o último teste de retenção. Os animais do grupo Pareado B, após estimulação com o padrão B, apresentaram um aumento significativo da marcação no circuito amígdalo-hipotalâmico. Os animais do grupo Pareado A, no entanto, apresentaram um aumento em estruturas do Córtex Pré-Frontal medial. Os resultados sugerem que, dependendo da valência adquirida durante a aprendizagem, a microestimulação temporalmente codificada ativa redes neuronais distintas concomitante a uma apropriada resposta comportamental. Em resumo, o Complexo Amigdaloide foi capaz de discriminar distintos padrões temporais de μES, dependendo da sequência binária previamente programada durante um paradigma de aprendizado associativo.

PALAVRAS CHAVE:
Complexo amigdaloide; Microestimulação elétrica; Condicionamento ao medo; Córtex Pré-Frontal; Codificação temporal.

ABSTRACT

Electrical microstimulation (μES) of primary sensory areas has shown some promising results on imputing information to the brain. In quite general terms, the modal perception is based on the area electrodes are placed, while the intensity of perception is driven by the μES frequency pattern. One unexplored possibility is that a single electrode delivering temporally coded stimuli, mimicking an asynchronous serial communication port to the brain, can trigger the emergence of different brain-states. Thus, this work tests the hypothesis if whether a specific polymodal associative area (the amygdaloid complex) may distinguish between two different temporally organized sequences of μES. In other words, if two binary sequences (same number of 0's and 1's bits), are used to control a μES device connected to the AMY, would it be possible to associate different qualia of perception to each binary sequence? Wistar rats (250 – 310 g) were submitted to a surgical implant of μES electrodes in the amygdala basolateral complex. Animals then underwent a classical conditioning paradigm, which consisted of pairing distinct patterns of μES (conditioned stimuli - biphasic square waves, 25 μA, λ 100 μs) to an unconditioned stimulus (footshock, 0.4 mA, during 2 s). The acquisition of conditioned behavior was evaluated by measuring the 'freezing' (no movements - except breathing - for 3 s). In the first protocol we used a periodic pattern of 6 Hz μES (166.7 ms inter pulse interval - IPI) as conditioned stimulus. The freezing response was significantly higher in the paired group (69 ± 5%) when compared to the unpaired group (25 ± 8%, $p < 0.001$). In the second protocol, we used two distinct temporal patterns of μES, both with six pulses per second: (A) 1110000111 and (B) 1001111001, with bits separated by a 10ms IPI. During the conditioning phase, all animals were stimulated as: 1) A-paired and B-unpaired; 2) A-unpaired and B-paired and 3) A-unpaired and B-unpaired. Conditioned behavior was evaluated for 3 consecutive days using only one μES pattern per day; respectively, pattern B – A – B. A proper conditioned response was observed, in Day 1, only for the B-paired group (B-paired: 49 ± 7%; A-paired: 22 ± 5%, $p < 0.05$; Unpaired: 13 ± 4%, $p < 0.001$). In Day 2, only the A-paired group showed significant freezing (B-paired: 10 ± 2%; A-paired: 49 ± 12%, $p < 0.001$; Unpaired: 8 ± 2%, $p < 0.001$). In Day 3 results were similar to Day 1 (B-paired: 42 ± 8%; A-paired: 27 ± 10%, p=ns; Unpaired: 14 ± 3%, $p < 0.01$). In order to determine the neural substrates recruited by the different stimulation patterns, c-Fos expression was evaluated one and a half hours after the last retention test. Animals conditioned to word-B, after stimulation with word-B, demonstrated increased hypothalamic c-Fos staining. Animals conditioned to word-A, however, showed increased prefrontal c-Fos labeling. In addition, prefrontal-cortex and hypothalamic c-Fos staining for, respectively, word-B and word-A conditioned animals, was no different than that of an unpaired control group. Our results suggest that, depending on the valence acquired from previous learning, temporally coded microstimulation activates distinct neural networks and associated behavior.

KEYWORDS:
Amygdaloid complex; Electrical microstimulation; Fear-conditioning; Prefrontal cortex; Temporal coding.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Codificação por Frequência 3
FIGURA 2: *The Grandmother Cell* 4
FIGURA 3: Codificação por População 5
FIGURA 4: Coerência e Competição 7
FIGURA 5: Análise de causalidade entre as relações rostro (V1) ←→ caudal (V4) (*Botton* → *UP*; *Top* → *Down*) ... 8
FIGURA 6: Padrões de sequências temporais de disparos repetidos ao logo do tempo – *Cortical songs* 9
FIGURA 7: Navegação guiada pela microestimulação elétrica 11
FIGURA 8: Interface Cérebro-Máquina 13
FIGURA 9: Codificação em diferentes *bursts* de frequência. 13
FIGURA 10: Ressonância magnética funcional. Mapa da estatística paramétrica para os grupos que receberam padrões temporais distintos de microestimulação elétrica 14
FIGURA 11: Núcleos do Complexo Amigdaloide de um rato 16
FIGURA 12: Complexo Amigdaloide. Diferentes métodos de marcação 16
FIGURE 13: Esquema do circuito de condicionamento ao medo 20

FIGURA 14: Padrões temporais de microestimulação elétrica 28
FIGURA 15: Setup experimental 29
FIGURA 16: Potenciação de longa duração 30
FIGURA 17: Setup experimental e Parâmetros de condicionamento 33
FIGURA 18: Protocolo de marcação com vermelho neutro 35
FIGURA 19: Histologia – Posicionamento dos eletrodos 35

FIGURA 20: Resposta condicionada baseada na microestimulação do Complexo Basolateral da Amígdala 41
FIGURA 21: Resposta condicionada a cada apresentação do padrão de microestimulação 42
FIGURA 22: Respostas condicionadas a cada apresentação dos respectivos padrões de microestimulação 43
FIGURA 23: Histograma e probabilidade de ocorrência do primeiro evento de *freezing* durante os Testes de Retenção 44

FIGURA 24: Córtex Pré-Frontal. Antecipação e predição em uma tomada de decisão 47
FIGURA 25: Modulação PFC sobre a resposta condicionada ao medo 48
FIGURA 26: Hipótese. Discriminação do medo condicionado. 49
FIGURA 27: Mosaico corte antero-posterior (AP – 2,8 mm). Tripla marcação *c-Fos*, NeuN, DAPI 53
FIGURA 28: Mosaico corte antero-posterior (AP ~+3,2 mm) tripla marcação *c-Fos*, NeuN, DAPI 54
FIGURA 29: Protocolo de tripla marcação *c-Fos*, NeuN, DAPI e análise da imunoreatividade de *c-Fos* 55

FIGURA 30: Imunofluorescência com tripla marcação no Hipotálamo, após a reapresentação do Padrão B, no terceiro dia do teste de retenção 60
FIGURA 31: Imunofluorescência com tripla marcação no Complexo Amigdalóide e Córtex Pré-Frontal, após a reapresentação do Padrão B, no terceiro dia do teste de retenção 61
FIGURA 32: Imunofluorescência com tripla marcação no Complexo Basolateral da Amígdala Direita, após a reapresentação do Padrão B, no terceiro dia do teste de retenção 62
FIGURA 33: Análise pareada da imunoreatividade de *c-Fos* 63
FIGURA 34: Correlação entre a imunoreatividade de *c-Fos* e o comportamento de *freezing* 64

LISTA DE TABELAS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 1, 2 e 3

TABELA 1: LISTA DE EQUIPAMENTOS COM DESCRIÇÃO DE MODELO E MARCA..... 36
TABELA 2: LISTA DE MATERIAIS E REAGENTES COM DESCRIÇÃO DE FABRICANTE E Nº DE CATÁLOGO 37
TABELA 3: LISTA DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS 38
TABELA 4: LISTA DE EQUIPAMENTOS COM DESCRIÇÃO DE MODELO E MARCA..... 56
TABELA 5: LISTA DE MATERIAIS E REAGENTES COM DESCRIÇÃO DE FABRICANTE E Nº DE CATÁLOGO 56
TABELA 6: LISTA DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS 57

LISTA DE ABREVIATURAS

µES - Microestimulação Elétrica
AB - Núcleo Basal Acessório
ABmc - Subdivisão Magnocelular do Núcleo Basal
ABpc - Amígdala Basal Parvocelular Acessória
AC - Córtex Cingulado Anterior
AGm - Córtex Agranular medial
AHA - Área Amígdalo-Hipocampal
AP - Ânteroposterior
AST - Área de Transição Amígdalo-Estriatal
B - Núcleo Basal
Baot - Núcleo do Trato Olfatório Acessório
Bi - Amígdala Basal Intermediária
BLA - Complexo Basolateral da Amígdala
BLAd - Complexo Basolateral Direito da Amígdala
BLAe - Complexo Basolateral Esquerdo da Amígdala
Bmc - Amígdala Magnocelular
BNST - Núcleo Basal da Estria Terminal
Bpc - Amígdala Basal Parvocelular
BS - Solução de Bloqueio
Ce – Núcleo Central da Amígdala
CeC - Amígdala Central Capsular
CeL - Amígdala Central Lateral
CeM - Amígdala Central Medial
Coa - Núcleo Cortical Anterior
Cop - Núcleo Cortical Posterior
CPu - Caudato Putâmen
CRs - Respostas Condicionadas
CS - Estímulo Condicionado
CTX - Córtex
DMD - Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo,
DMV -Núcleo Motor Dorsal do Vago
DV – Dorsoventral
e.c. - Cápsula Externa
ES-NP - Microestimulação Padrão Não Periódico
ES-P - Microestimulação Padrão Periódico
I - Núcleo Intercalado
IL - Córtex Infra-Límbico
IPIs - Intervalos Interpulso
IT - Inferotemporal
La – Núcleo Lateral da Amigdala
Ladl - Subdivisão Dorsolateral da Amígdala Lateral
Lam - Subdivisão Lateral da Amígdala Medial
Lavl - Subdivisão Ventrolateral Anterior da Amígdala Lateral
Lcvl - Subdivisão Ventrolateral Caudal da Amígdala Lateral
LDL -Amígdala Dorsolateral
LFP - Potencial de Campo Local
LTP – Potenciação de longa duração
LL - Láterolateral
LM - Amígdala Lateral
M1 - Córtex Motor Primário
Mcd - Subdivisão Dorsal da Amígdala Medial
Mcv - Subdivisão Ventral da Amígdala Medial
mPFC - Córtex Pré-Frontal Medial
Mr - Subdivisão Rostral da Amígdala Medial
NA - Núcleo Ambíguo
Nlot - Núcleo do Trato Olfatório Lateral
PaC - Córtex Periamigdaloide
PAG - Substancia Cinzenta Periaquedutal
PB - Solução Tampão Fosfato
PBS - Solução Tampão Fosfato Salina
PFA - Paraformoldeído
PFC - Córtex Pré-Frontal
Pir - Córtex Piriforme
PMd - Córtex Pré-Motor Dorsal
PrL - Córtex Pré-Limbico
PVH - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
PVP - Polivinilpirrolidona
ROI's - Regiões de Interesse
RPC - Núcleo Reticular Ponto Caudal
RVL - Núcleo Ventrolateral Rostral da Medula
ST - Estria Terminal
S1 - Córtex Somatossensorial Primário.
US - Estímulo Não Condicionado
VM - Córtex Pré-Frontal Ventromedial
VMD - Núcleo Ventromedial do Hipotálamo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **1**
1.1 PROCESSAMENTO SENSORIAL **2**
1.2 MICROESTIMULAÇÃO ELÉTRICA INTRACORTICAL **10**
1.3 COMPLEXO AMIGDALOIDE – ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS **15**
2. JUSTIFICATIVA **21**
3. OBJETIVOS **24**
OBJETIVO GERAL **25**
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 1 ..... **25**
OBJETIVO ESPECÍFICO 2 ..... **25**
4. MATERIAL E MÉTODOS **26**
4.1 SETUP DE MICROESTIMULAÇÃO **27**
4.2 PADRÕES TEMPORAIS DE MICROESTIMULAÇÃO ELÉTRICA **27**
4.3 SUJEITO EXPERIMENTAL **28**
4.4 CIRURGIA PARA IMPLANTE DE ELETRODOS **29**
4.5 CONDICIONAMENTO AO MEDO **30**
4.5.1 PARADIGMAS DE CONDICIONAMENTO AO MEDO **31**
4.5.1.1 PARADIGMA DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AO MEDO **31**
4.5.1.2 PARADIGMA DISCRIMINATÓRIO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO **32**
4.5.2 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO CONDICIONADO **34**
4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA – POSICIONAMENTO DOS ELETRODOS **34**
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA **35**
4.8 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS, REAGENTES E SOLUÇÕES **36**
5. RESULTADOS **39**
5.1 PARADIGMA DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AO MEDO **40**
5.2 PARADIGMA DISCRIMINATÓRIO CONDICIONAMENTO AO MEDO **40**
6. O DUELO EM UMA TOMADA DE DECISÃO **45**
OBJETIVO ESPECÍFICO 3 ..... **48**
7. MATERIAL E MÉTODOS **50**
7.1 IMUNOFLUORESCÊNCIA **51**
7.1.1 PROTOCOLO DE TRIPLA MARCAÇÃO *C-FOS,* NEUN E DAPI **51**
7.1.2 ANÁLISE DA IMUNOREATIVIDADE (IR) DE *C-FOS* **52**
7.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA **56**
7.3 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS, REAGENTES E SOLUÇÕES **56**
8. RESULTADOS **58**
9. DISCUSSÃO **65**
10. CONCLUSÃO **72**
11. PERSPECTIVAS **73**
12. REFERENCIAS **84**
APENDICE **98**
ANEXOS **120**

1. INTRODUÇÃO

1.1 PROCESSAMENTO SENSORIAL

> *"(...) from a brain linked to what is "out there" by a few million fragile sensory nerve fibers, our only information channels, our lifelines to reality. They provide also what is essential for life itself: an afferent excitation that maintains the conscious state, the awareness of self"*
>
> MOUNTCASTLE, V. B.
> The view from within: pathways to the study of perception.
> *Johns Hopkins Med J*, v. 136, n. 3, p. 109-31, Mar 1975

Como a informação ambiental é codificada? E, a partir dessa codificação, como o indivíduo cria respostas adaptativas, constrói relações com o ambiente, arquiteta "memórias/histórias" e define suas experiências como significativas?

Há muito já se sabe que a informação ambiental é recebida por inúmeros sensores distribuídos pelo corpo. Esses sensores são células especializadas que, como transdutores de sinal, convertem os estímulos sensoriais físicos e/ou químicos em sinais neuronais (Adrian e Zotterman, 1926).

As primeiras evidências a respeito da codificação da informação sensorial partiram de estudos como o do eletrofisiologista britânico Edgar Adrian, no início do século 20. Em um de seus trabalhos, eletrodos de registro foram posicionados no nervo óptico de um anfíbio submetido a estímulos visuais. A amplificação do sinal demonstrou que a diferença de potencial presente nas células nervosas gerava significativas descargas elétricas (Hodgkin, 1979).

> *"I had arranged electrodes on the optic nerve of a toad in connection with some experiments on the retina. The room was nearly dark and I was puzzled to hear repeated noises in the loudspeaker attached to the amplifier, noises indicating that a great deal of impulse activity was going on. It was not until I compared the noises with my own movements around the room that I realized I was in the field of vision of the toad's eye and that it was signaling what I was doing."*
>
> HODGKIN, A..
> Edgar Douglas Adrian, Baron Adrian of Cambridge. 30 November 1889-4 August 1977.
> Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society, v. 25, p. 1-73, Nov 1979

Edgar Adrian ainda fez outras importantes contribuições no estudo das respostas sensoriais. Em um simples experimento de registro da atividade sensorial, onde eletrodos foram posicionados em terminações nervosas aferentes de um tecido muscular, observou-se um aumento da frequência da atividade dos sinais registrados à medida em que diferentes estímulos, aplicados por pesos com diferentes magnitudes, eram sustentados pelo tecido (Adrian, 1926; Adrian e Zotterman, 1926) (FIGURA 1)

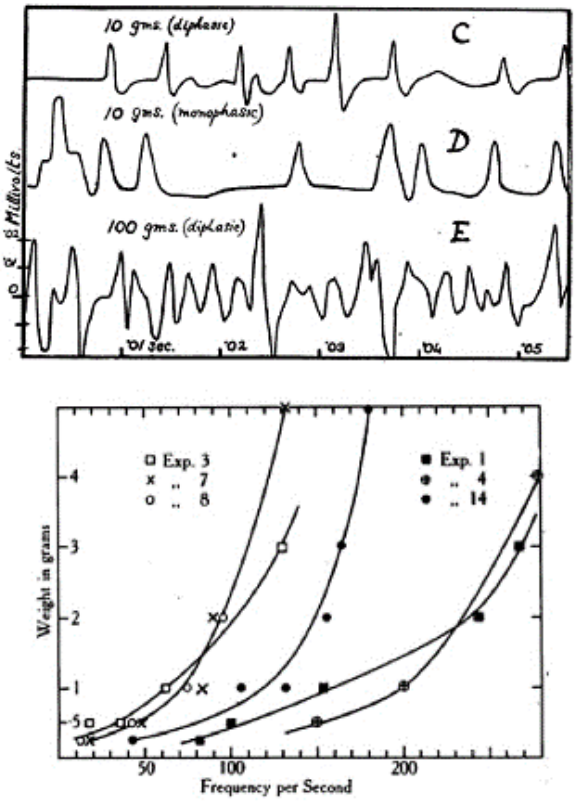


FIGURA 1: Codificação por Frequência. Painel Superior Análise dos registros. Pesos com diferentes magnitudes (C e D, 10g, diferentes eletrodos de registro; E, 100g registro bifásico) eram sustentados pelo tecido muscular. **Painel Inferior:** relação entre a frequência e os diversos pesos em vários músculos intactos (adaptado de: Painel Superior: Adrian, 1926. The impulses produced by sensory nerve-endings: Part I. The response of a Single End-Organ. Painel Inferior: Adrian e Zotterman, 1926. The impulses produced by sensory nerve-endings: Part II. The response of a Single End-Organ).

A partir desses resultados, podemos concluir que o primeiro estágio da codificação sensorial ocorre em sensores ambientais, ou receptores sensoriais. Esses receptores, através de alterações de seus potenciais elétricos transmembrânicos, geram sinais ou disparos de potenciais de ação. Esses sinais são transmitidos ao longo de consideráveis distâncias e traduzem a intensidade dos estímulos por meio de diferentes frequências de disparo (Adrian, 1964).

Ao longo das últimas décadas, a codificação pela frequência de disparos tornou-se uma ferramenta comum para descrever as propriedades funcionais das redes neurais. Propriedades relacionadas principalmente aos neurônios que compõem o sistema sensório-motor. Nesse contexto, a utilização de técnicas de medida baseadas na frequência ganharam popularidade, devido à grande reprodutibilidade das respostas e à relativa facilidade de, experimentalmente, mensurar e categorizar a atividade neural (Schwindt *et al.*, 1997).

Contudo, evidências sugerem que, mesmo em sistemas sensório-motores, 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).

Diferentes formas de processamento da informação têm sido largamente discutidos pela literatura (Rumelhart e Mcclelland, 1986; Freeman, 1991; Singer, 1999a; b; Averbeck e Lee, 2004; Masuda e Aihara, 2007) com base principalmente no avanço e no refinamento nas técnicas de registro da atividade neural. Dentre essas técnicas, destaca-se o implante de multieletrodos capazes

de registrar a atividade de um único neurônio ou de uma grande população de células nervosas no parênquima cerebral, permitindo a investigação tanto da natureza das interações entre os neurônios quanto de suas respostas frente à apresentação de estímulos ambientais (Buzsaki *et al.*, 2012).

Embora ainda seja uma questão de debate quanto à forma como a informação é codificada, tem-se como consenso que o cérebro não se restringe a apenas uma possibilidade de codificação (Rolls e Treves, 2011). Por exemplo, Quiroga et al. (2005) demonstraram que um pequeno grupo de neurônios (ou um único neurônio) podem ser responsáveis pela percepção de um conjunto bem definido de características sensoriais. Em seu experimento, unidades neuronais registradas no lobo parietal medial de humanos apresentaram respostas seletivas a imagens representativas de uma mesma pessoa ou local. Essas respostas foram significativas até mesmo para uma sequência de letras relativas ao nome da pessoa/local analisado (Quiroga *et al.*, 2005) (FIGURA 2). Esses resultados em humanos foram muito semelhantes aos encontrados em registros de neurônios visuais no córtex temporal inferior de primatas quando estes foram apresentados a semelhantes estímulos visuais (imagens de faces) (Perrett *et al.*, 1982; Perrett *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 2005; Leopold *et al.*, 2006).

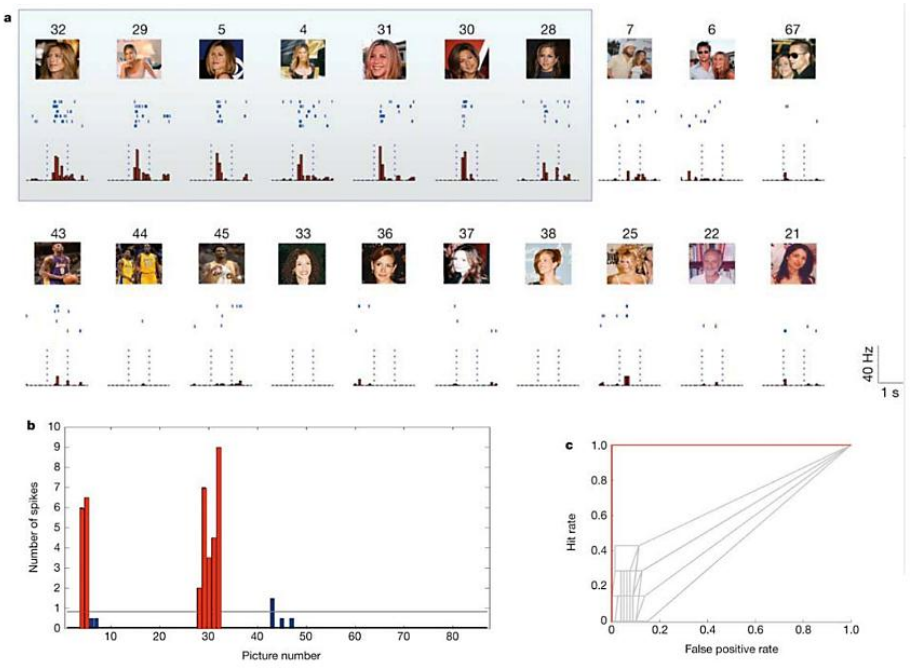


FIGURA 2: The Grandmother Cell. Uma única unidade neuronal registrada no hipocampo posterior esquerdo foi ativado exclusivamente por diferentes imagens da atriz Jennifer Aniston. **a,** Algumas respostas relacionadas as 87 imagens apresentadas. Não houve respostas significativas para as outras 57 imagens apresentadas. Abaixo de cada imagem estão representados tanto a atividade neuronal (acima) quanto o relativo histograma (abaixo). As linhas verticais tracejadas indicam o início e o fim da apresentação (1s de intervalo). **b,** Mediana das respostas a todas as imagens. A abscissa corresponde aos números das imagens representadas em a. As duas linhas horizontais representam respectivamente a média da atividade basal (0,02 pontos) e a média mais 5 D.P. (desvio padrão) (0,82 pontos). As imagens da Jennifer Aniston são indicados por barras vermelhas. **c,** Curva ROC associada a resposta (traço vermelho). Esta testa a hipótese de que a célula respondeu de forma invariável para todas as sete fotografias de Jennifer Aniston, mas não a outras imagens (incluindo fotografias de Jennifer Aniston e Brad Pitt juntos, falsos positivos). As linhas cinzas correspondem à mesma análise ROC para 99 apresentações aleatórias de 7 imagens falso positivos (P, 0,01). A área sob a curva em vermelho é 1,00 (adaptado de: Quiroga, 2005).

Os resultados apresentados por Quiroga et. al (2005) aproximam-se muito de um conceito cunhado na década de 60 por Jerzy Konorski (*gnostic neuron*) e mais tarde por Jerome Ysroael Lettvin (*the grandmother cell*). Esse conceito, além de determinar características polimodais para a unidade neuronal, tem por base a hipótese que um único neurônio é capaz de responder de forma invariante a um conjunto de estímulos específicos e complexos, culminando com a percepção de um único e determinado conceito (Konorski, 1967; Gross, 2002).

Devido à redundância apresentada pelo *the grandmother cell*, no sentido de que não apenas uma e sim várias células podem responder a um determinado estímulo ou conjunto de características sensoriais, parte das subsequentes hipóteses formuladas pela literatura passaram a ignorar o processamento invariante gerado por poucas unidades neuronais. As novas hipóteses concentram-se principalmente na gênese e organização dos padrões de ativação (Gross, 2002). Padrões funcionais podem ser gerados localmente por uma população neuronal específica, cuja atividade determina específicas funções (Georgopoulos *et al.*, 1986) (FIGURA 3), ou podem ser gerados esparsamente, distribuídos entre grandes redes neuronais, formando padrões únicos e/ou temporalmente precisos (Rumelhart e Mcclelland, 1986; Varela *et al.*, 2001; Singer, 2009).

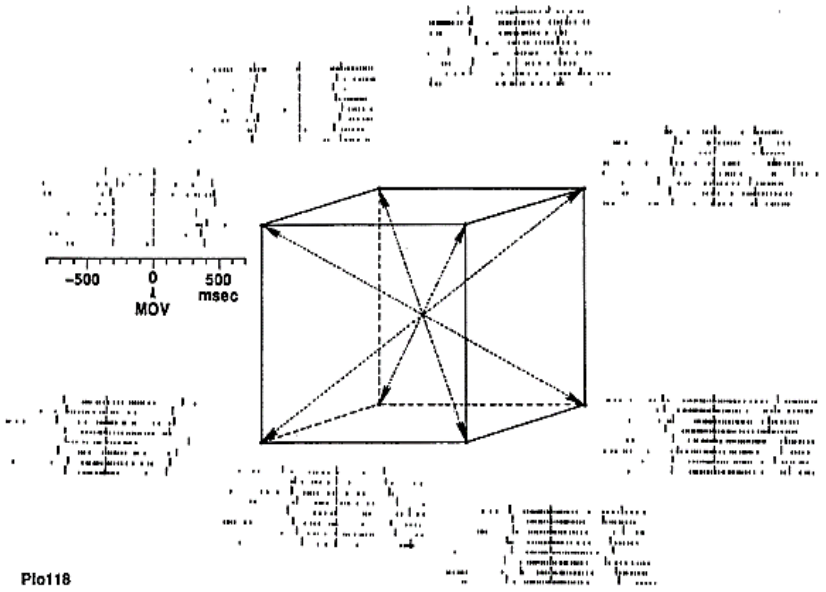


FIGURA 3: Codificação por População. Populações específicas de células no córtex motor são responsáveis por direções específicas, de deslocamento de um membro, em diversas tarefas. Na figura estão representadas a atividade de unidades celulares responsivas, de acordo com os movimentos do braço de um primata em oito diferentes direções (desenho central). Representação de 8 tentativas. Nos diagramas ao redor, as barras mais curtas representam a ocorrência de disparos neuronais. As barras mais longas indicam, da esquerda para direita: o aparecimento do alvo, seguido pelo início do movimento (MOV alinhamento no tempo Zero) e o fim do movimento. Diferenças significativas ($p < 0,0001$, teste F) na análise entre os 8 diferentes movimentos.

Nesse sentido, evidências demonstram que os processos de codificação podem tornar-se cada vez mais complexos e menos localizados em termos de anatomia, à medida em que os sinais se propagam através das redes neurais, alcançando estruturas cada vez mais rostrais (Varela *et al.*, 2001).

Sabe-se que o processamento de estímulos externos pode variar de uma apresentação para outra dependendo das atividades oscilatórias, temporalmente codificadas, intrínsecas do sistema. Os estados de funcionamento cerebrais, modulados por estruturas mais rostrais (modulação rostro ←→ caudal; *top-down*), 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).

Uma grande quantidade de circuitos oscilatórios têm sido identificados através do registro de potenciais de campo local (LFP). Nestes registros, as baixas frequências identificadas podem representar a atividade de grandes circuitos (Aru *et al.*, 2014; Rey *et al.*, 2014). Estes grandes circuitos, por sua vez, podem codificar a informação dentro de janelas de tempo específicas, por meio do acoplamento/sincronização com a atividade das redes neurais subjacentes. Dessa maneira, uma organização temporal, em fase, entre as atividades oscilatórias, tem sido proposta como uma forma de modulação do fluxo das informações ao longo das redes neuronais (Varela *et al.*, 2001).

Fries et al. (2001) demonstraram em macacos que, durante uma tarefa de discriminação visual, a atenção seletiva a um dos estímulos apresentados era determinada pela sincronização temporal da atividade dos neurônios do córtex visual V4 com o LFP. Em linhas gerais, a atividade neuronal registrada foi comparada através da apresentação de dois estímulos que recrutavam dois diferentes campos receptivos, com projeções a V4. De acordo com os resultados, durante os intervalos entre as apresentações, a sincronização entre pares de eletrodos ocorreu em bandas de frequências por volta de 17 Hz, ao passo que durante a apresentação de ambos os estímulos, a sincronização dessas frequências reduzia e duas bandas distintas passaram a sincronizar de forma significativa, uma abaixo de 10 Hz (banda Teta) e outra entre 35 e 60 Hz (banda Gama). Embora a frequência de disparo em ambos os campos registrados em V4 estivesse levemente aumentada para ambas as condições apresentadas, observou-se uma maior sincronização temporal dos disparos apenas quando o comportamento atencional estava direcionado ao estímulo tido como relevante (Fries *et al.*, 2001).

Assim, com base no experimento anterior, observou-se que, a partir de um estímulo ambiental, a sincronização entre substratos neurais pode vir a ser um mecanismo crucial para a execução de respostas comportamentais biologicamente relevantes. (Singer, 1993; Fries, 2005) (FIGURA 4). Se dois estímulos em um mesmo espectro sensorial recrutam dois diferentes campos receptivos, os grupos neuronais ativados providenciarão sinais convergentes (competitivos) para

um grupo de neurônios adjacentes, mais rostrais da via, pertencentes ao próximo estágio do processamento. Esses dois diferentes sinais de entrada serão rítmicos e individualmente sincronizados, mas como partem de duas fontes, não serão necessariamente síncronos entre si (Eckhorn *et al.*, 1988; Gray *et al.*, 1989).

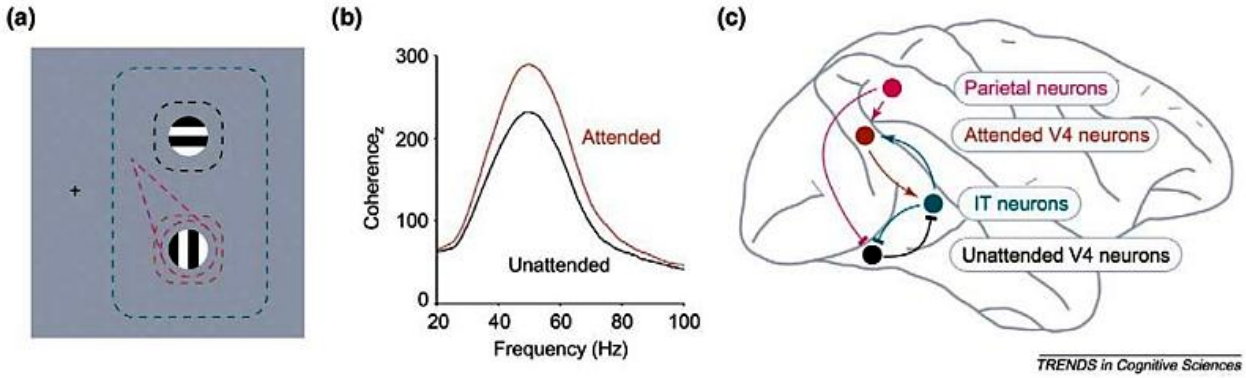


FIGURA 4: Coerência e Competição. **(a)** configuração do estímulo utilizado em um experimento de atenção visual. O estímulo inferior está circulado por uma linha tracejada em vermelho (disposto horizontalmente para o animal experimental) que ativa o campo receptivo em um agrupamento neuronal na região de V4. Ambos os estímulos ativam um campo receptivo em um agrupamento neuronal no córtex visual ínfero temporal (IT). A atenção seletiva está direcionada para o estímulo circulado por uma linha tracejada em vermelho. **(b)** Embora a frequência de disparo dos neurônios registrados em V4 esteja levemente aumentada para ambos os estímulos, observa-se um forte aumento da coerência da banda Gama apenas para o grupo que participa do processo atencional. **(c)** Os diferentes grupos neuronais em V4 e IT foram ativados pelo estímulo apresentado em **(a)**. Evidências experimentais sugerem que apenas os neurônios de V4 que participam do processo atencional comunicam-se efetivamente com os neurônios de IT. Isto está indicado pelas setas com pontas, demonstrando o possível sinal modulatório do córtex parietal, que facilita a atividade e a competição dos respectivos neurônios recrutados em V4 (adaptado de: Fries, 2005).

A hipótese da comunicação neuronal baseada na coerência temporal em substratos neurais (Fries, 2005) foi ainda claramente confirmada em um outro experimento desenvolvido pelo mesmo grupo (FIGURA 5). De forma semelhante ao trabalho descrito anteriormente, Bosman et al. (2012) realizaram uma tarefa de atenção visual seletiva em macacos, concomitante ao registro da atividade eletrofisiológica. Nesse trabalho, eletrodos de registro também foram implantados no córtex visual V4 e em dois campos receptivos em V1 que se projetavam sobre V4 e eram responsivos, cada um deles, a um diferente estímulo visual. De acordo com os resultados, quando o comportamento atencional era direcionado a um dos estímulos visuais, tido como relevante, V4 apresentava uma coerência temporal de grande magnitude, com uma sincronização seletiva com apenas com o respectivo campo receptivo ativado em V1 (Bosman *et al.*, 2012).

Diversas outras evidências também demonstraram que, durante processos atencionais, a sincronização temporal das atividades oscilatórias entre substratos cerebrais é um elemento crucial para a facilitação e modulação dos sinais sensoriais (Fries *et al.*, 2001; Fries *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2008; Bosman *et al.*, 2012; Manzur *et al.*, 2013; Bosman *et al.*, 2014). De forma

dinâmica, essa modulação é capaz de ativar respostas motoras para uma coordenação sensório-motora apropriada e flexível (Bosman *et al.*, 2012; Likhtik *et al.*, 2014).

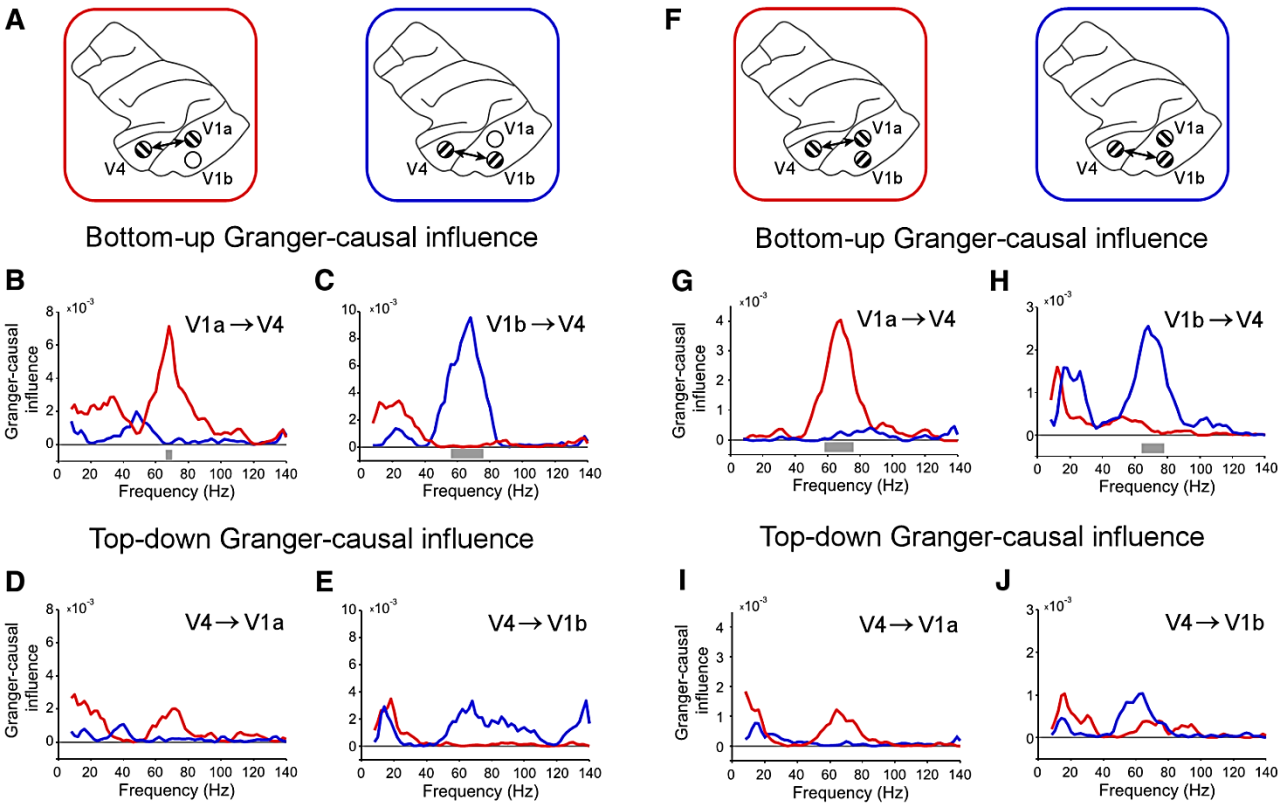


FIGURA 5: Análise de causalidade entre as relações rostro (V1) ←→ caudal (V4) (*Botton → UP*; *Top → Down*). **A.** Recrutamento dos campos receptivos em V1(a e b) e V4, em virtude da apresentação de cada estímulo visual: 1 (em vermelho) e 2 (em azul). As setas representam o sincronismo entre os respectivos substratos. **B-C.** V4 foi seletivamente influenciado em Gama pelos campos receptivos recrutados em V1 (*Botton → UP*). **D-E.** V4 exerceu seletivamente uma influência, aos campos receptivos recrutados em V1 (*Top → Down*). F. Recrutamento dos campos receptivos em V1(a e b) e V4, em virtude da apresentação simultânea do estímulos visuais. As setas representam o sincronismo em virtude do estímulo tido como relevante. **G.** Influência de V1a sobre V4. **H.** Influência de V1b sobre V4. **I.** Influência de V4 sobre V1a. **J.** Influência de V4 sobre V1b. As barras cinzas abaixo do espectro indicam as frequências exatas com efeitos significantes. (adaptado de: Bosman, 2012).

A importância de se quantificar o sincronismo neural associado a função tem estimulado o desenvolvimento de ferramentas matemáticas especializadas que se fazem necessárias para a análise das relações temporais nas redes neurais. Relações estas muitas vezes independentes da amplitude do comportamento oscilatório das redes ressonantes. Essas ferramentas têm permitido a detecção de padrões de ativação espaçotemporais gerados tanto a partir de estímulos sensórios específicos (Laurent *et al.*, 1996; Normann *et al.*, 2001; Tort *et al.*, 2010) quanto a partir da própria atividade espontânea da rede neural estudada. Nesse caso, dentro de uma escala de segundos a minutos e com uma precisão de milissegundos (Ikegaya *et al.*, 2004).

Através do registro da atividade multiunitária, Ikegaya et al. (2004) demonstraram que neurônios neocorticais apresentavam repetições precisas de seus padrões espontâneos de disparo. Esses padrões de atividade espontânea flutuaram ao longo do tempo e envolveram diferentes células. Além disso, mesmo apresentando estruturas espaciais distintas, repetiram suas sequências de ativação, minutos depois, mantendo uma precisão em milissegundos e perdurando durante dezenas de segundos (Ikegaya et al., 2004) (FIGURA 6).

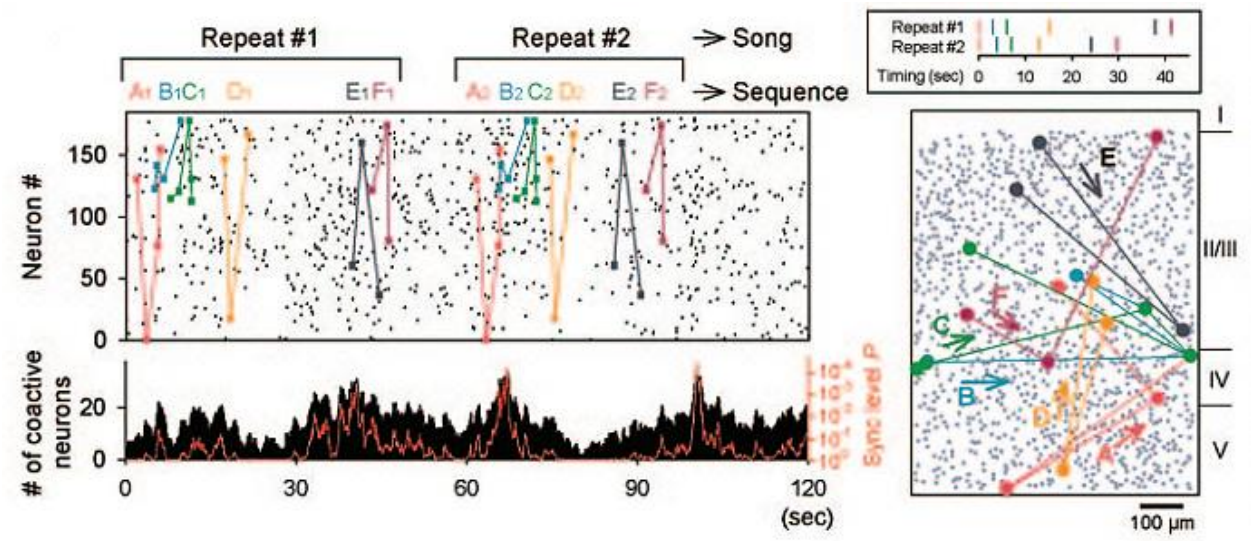


FIGURA 6: Padrões de sequências temporais de disparos repetidos ao logo do tempo – *Cortical songs*. O painel superior esquerdo representa 181 de um total de 1197 neurônios que demonstraram atividade espontânea, além dos subconjuntos de neurônios que exibiram sequências temporais precisas de atividade (A1 a F2). As sequências se repetiram na mesma ordem (A>B>C>D). O histograma abaixo representa o número de células ativas ao longo do tempo. A linha vermelha expressa o valor de P referente à sincronização, definida pelos intervalos randômicos inter-sinais. O painel direito demonstra o momento inicial da temporalização dos sinais (acima) e a localização das células (abaixo) (adaptado de: Ikegaya, Y. et al., 2004).

Muito se discute na literatura a respeito de geradores centrais de padrões de atividade neuronal (Hooper, 2001), caracterizados por ritmos endógenos e dinâmicos, com dois ou mais processos de interação e que podem garantir funções biológicas das mais variadas (Lund, 1991; Golubitsky *et al.*, 1999; Stein, 1999; Hooper, 2001; Llinas, 2001; Grinvald *et al.*, 2003; Dresp-Langley e Durup, 2009; Guertin e Steuer, 2009). Apesar de toda discussão, vale ressaltar que evidências quanto à capacidade de uma rede neural de gerar padrões endógenos com organizações temporais precisas e reverberantes (Lorente De No, 1938; Abeles, 1991) ainda são escassas.

1.2 MICROESTIMULAÇÃO ELÉTRICA INTRACORTICAL

Em neurociências, a relação entre um estímulo sensorial e a resposta neural pode ser estudada basicamente de duas maneiras: a partir de uma variedade de estímulos naturais ou artificiais, focando no entendimento de como uma rede neural os codifica e os representa, ou de forma "inversa", reconstruindo uma forma de estimulação a partir da decodificação das respostas neurais evocadas por um estímulo (Koyama, 2012).

Ao longo de mais de um século de experimentação, a estimulação elétrica de tecidos cerebrais tem sido proposta como uma alternativa para induzir artificialmente funções corticais (Fritsch e Hitzig, 1870). Atualmente essa técnica tem sido refinada através do implante de microeletrodos em substratos neurais específicos e com o uso de parâmetros mínimos de estimulação (Clark *et al.*, 2011).

Os protocolos de microestimulação são comumente utilizados tanto para o mapeamento de circuitos neurais, conjugando técnicas de imunohistoquímica (Heynen e Bear, 2001; Medeiros *et al.*, 2014) ou de ressonância magnética funcional, (Moeller *et al.*, 2008; Mesquita *et al.*, 2011) quanto para o estudo dos mecanismos envolvidos na plasticidade sináptica (Malenka e Nicoll, 1999).

Dentre as diversas aplicações, evidências experimentais clássicas já demonstraram que a potenciação de longa duração (LTP) entre dois agrupamentos neuronais pode ser fortemente favorecida quando padrões tetânicos de estimulação são aplicados. Mais especificamente, quando aplicados em fase ao ritmo teta hipocampal (Greenstein *et al.*, 1988; Pavlides *et al.*, 1988; Hyman *et al.*, 2003) ou diretamente em circuitos sensoriais primários, junto à apresentação do estímulo sensorial (Maldonado e Gerstein, 1996; Heynen e Bear, 2001; Koralek *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013). A microestimulação ainda pode ser utilizada como estímulo condicionado, pareada a estímulos ambientais relevantes em protocolos clássicos de memória e aprendizado (Kwon e Choi, 2009).

Desde os estudos pioneiros de mapeamento cerebral realizados por Wilder Penfield na década de 50 (Penfield e Rasmussen, 1950), diversas evidências demonstram claramente que a microestimulação elétrica é capaz evocar artificialmente fenômenos mentais complexos, incluindo percepções, memórias e experiências (Salzman *et al.*, 1990; Mesulam, 1998; Romo *et al.*, 2000; Talwar *et al.*, 2002; Otto *et al.*, 2005; Afraz *et al.*, 2006; Kwon e Choi, 2009; O'doherty *et al.*,

2009; O'doherty *et al.*, 2011; Venkatraman e Carmena, 2011). Esse tipo de evidência torna esta técnica uma poderosa ferramenta para o estudo das relações entre o cérebro e o comportamento.

A possibilidade de fornecer pistas sensoriais ambientais que garantiram a execução de tarefas complexas em diferentes modelos comportamentais, tanto para ratos (Talwar *et al.*, 2002; Venkatraman e Carmena, 2011) quanto para primatas (Mesulam, 1998; Romo *et al.*, 2000; O'doherty *et al.*, 2009), já vem sendo demonstrada por muitos autores.

Baseado em um estudo clássico no qual James Olds e Peter Milner, em 1954, demonstraram que a microestimulação elétrica da área septal poderia ser utilizada como reforço em uma tarefa de condicionamento operante (Olds e Milner, 1954), pesquisadores na *State University of New York*, coordenados por John K. Chapin, conseguiram guiar o comportamento exploratório de ratos em um ambiente com vários obstáculos e de difícil locomoção. Por meio da microestimulação elétrica do córtex somatossensório direito e/ou esquerdo (*barrel córtex*, que recebe informações somatossensórias das vibrissas), o animal experimental obedecia ao comando de navegação dado pelo experimentador. Neste experimento de condicionamento operante, a recompensa foi fornecida também por meio da microestimulação elétrica, em projeções diretas ao núcleo *accumbens,* com aplicações pareadas ao estímulo no córtex somatossensório. Ambos os estímulos foram fornecidos em tempo real e em momentos específicos da trajetória do animal (Talwar *et al.*, 2002) (FIGURA 7).

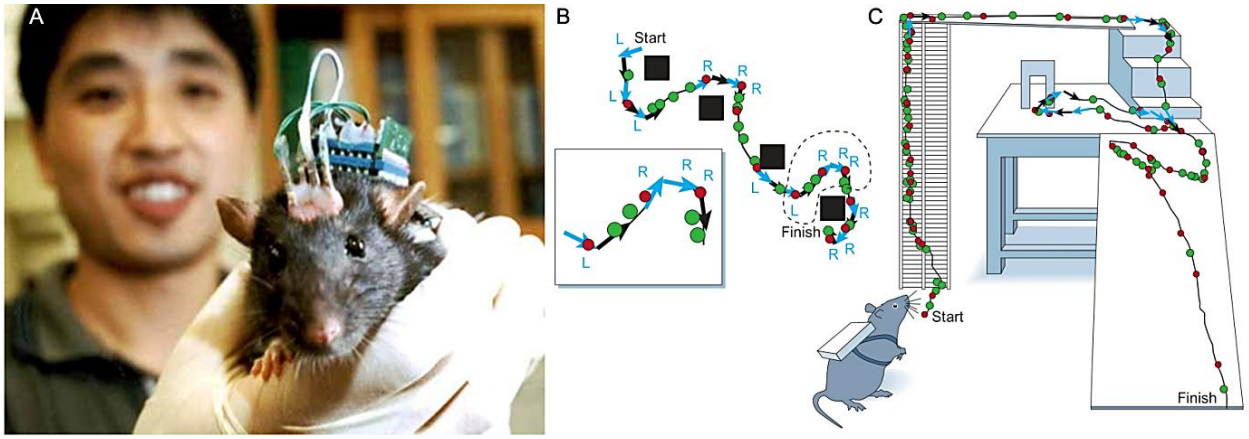


FIGURA 7: Navegação guiada pela microestimulação elétrica. **A.** R*emotely-guided rat*. **B.** Rota em ziguezague seguida pelo rato. Pontos vermelhos indicam a posição da cabeça em intervalos de 1 s; Pontos verdes indicam a apresentação da recompensa através da microestimulação em projeções para o núcleo *accumbens*; Setas azuis indicam a direção ordenada; Setas pretas indicam a posição após 0,5 s do comando de direção ordenado. **C.** Rota com obstáculos complexos seguida pelo rato. Duas tentativas seguidas, com grande densidade de estímulos de recompensa, foram necessários para guiar a descida do rato pela rampa (70º). O número de recompensas aplicadas demonstra o elevado grau motivacional desencadeado pela microestimulação (adaptado de: Talwar, Xu *et al.*, 2002)

Na última década, a literatura tem apresentado sistemas cada vez mais automatizados que permitem uma estreita relação entre o cérebro e sistemas eletrônicos/computacionais. Esses sistemas - ou interfaces cérebro-máquinas - têm permitido grandes avanços no restabelecimento de funções biológicas, tanto sensoriais quanto motoras, com a criação de neuropróteses funcionais (Chapin e Moxon, 2000; Nicolelis, 2001) que, em parte, fazem o uso da microestimulação elétrica como uma forma de mimetizar os sinais sensoriais ambientais.

Um dos primeiros exemplos de interface cérebro-máquina baseada na retroalimentação sensorial é a prótese auditiva. Esse dispositivo converte sinais acústicos ambientais em microestimulações elétricas. Por sua vez, a microestimulação é aplicada através de um arranjo de eletrodos cronicamente implantados nas fibras do nervo auditivo, sob a membrana basilar da cóclea, com diferentes codificações espaciais. A característica tonotópica da membrana basilar permite que a codificação espacial da estimulação, por diferentes frequências dentro do espectro auditivo, mimetize o processamento primário da via de entrada do sistema, possibilitando novamente a audição (Merzenich *et al.*, 1974; Fallon *et al.*, 2008).

Outras aplicações diretas da microestimulação elétrica objetivam o restabelecimento de outras funções sensoriais, como por exemplo a visão (Dobelle *et al.*, 1974), além de alternativas para o tratamento e alívio de dores crônicas (Tsubokawa *et al.*, 1991; 1993; Garcia-Larrea *et al.*, 1999), restabelecimento do controle motor em desordens neurodegenerativas (Benabid *et al.*, 1991; Limousin *et al.*, 1998) e como alternativa em epilepsias refratárias, não responsivas ao tratamento medicamentoso ou cirúrgico (Cooper *et al.*, 1984; Upton *et al.*, 1987).

Hoje, provavelmente devido ao apelo motivado por lesões medulares, boa parte dos trabalhos utilizam a microestimulação elétrica em interfaces cérebro-máquina híbridas (registro ←→ estímulo). A título de exemplo, O'doherty et. al. (2009) conjugou a retroalimentação sensorial, baseada na microestimulação do córtex somatosensorial, com a decodificação do registro da atividade de neurônios do córtex motor primário (FIGURA 8). A atividade decodificada do córtex motor primário por sua vez, possibilitou o movimento de atuadores mecânicos, como cursores em uma tela e/ou dispositivos robóticos (O'doherty *et al.*, 2009; O'doherty *et al.*, 2011).

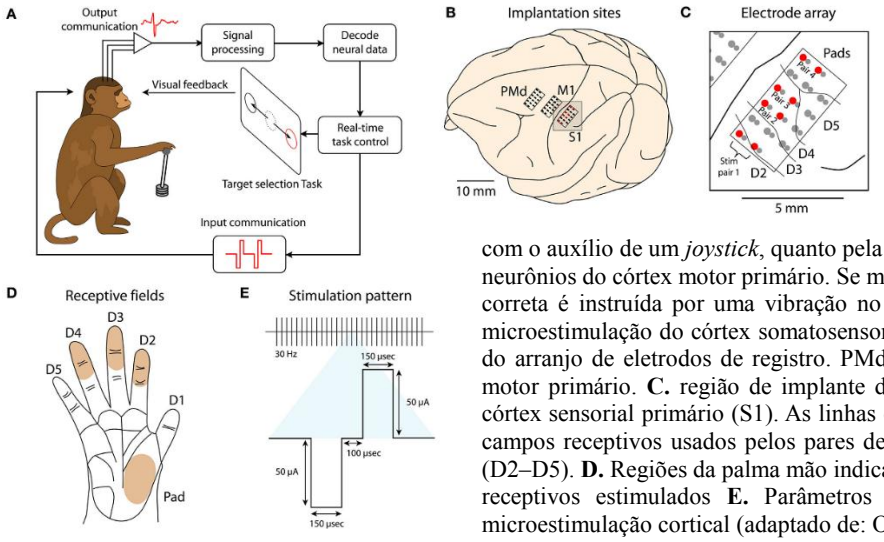


FIGURA 8: Interface Cérebro-Máquina Esquema do paradigma experimental: **A.** Macaco sentado em frente à tela em que as imagens do cursor e dos trajetos visuais são projetadas. O animal alcança o alvo com o cursor, tanto manualmente com o auxílio de um *joystick*, quanto pela codificação do registro da atividade de neurônios do córtex motor primário. Se mais de um lado é apresentado, a direção correta é instruída por uma vibração no joystick ou artificialmente através da microestimulação do córtex somatosensorial primário (S1). **B.** Sítio de implante do arranjo de eletrodos de registro. PMd: córtex pré-motor dorsal; M1: córtex motor primário. **C.** região de implante do eletrodos para microestimulação no córtex sensorial primário (S1). As linhas entre os pontos indicam os respectivos campos receptivos usados pelos pares de eletrodos, entre as digitais dos dedos (D2–D5). **D.** Regiões da palma mão indicando as respectivas regiões dos campos receptivos estimulados **E.** Parâmetros do trem de pulso utilizado para a microestimulação cortical (adaptado de: O'doherty, Lebedev *et al.*, 2009).

Em outro trabalho, o mesmo grupo evidenciou que macacos são capazes de discriminar diferentes configurações de estímulos. Nesse caso os estímulos eram dois padrões de microestimulação, codificados em diferentes *bursts* de frequência e aplicados como *feedback* no córtex somatossensorial. Utilizando uma metodologia semelhante de estímulo-registro, o animal experimental guiou um atuador mecânico, discriminando duas contingências diferentes baseadas nas duas informações táteis artificiais (O'doherty *et al.*, 2011) (FIGURA 9).

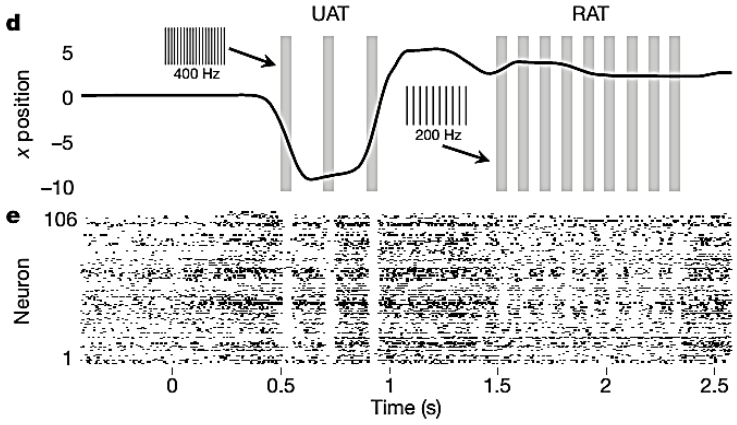


FIGURA 9: Codificação em diferentes *bursts* de frequência. d. Representação do movimento do atuador mecânico e a exploração de cada um dos estímulos sensoriais. Barras cinza indicam a configuração dos padrões e as respectivas frequências de estimulação. **e.** Representação dos neurônios registrados em M1 durante a tentativa de exploração representada em d. (adaptado de: O'doherty, Lebedev *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que, nos resultados e experimentos mencionados acima, o estímulo foi sempre aplicado em porções mais caudais do circuito sensorial, com uma função clara de retroalimentação, transmitindo as informações de sensores artificiais para o cérebro. Nessas situações, a microestimulação mimetizou uma sensação específica, apresentando aplicações óbvias para pacientes lesionados em porções mais caudais das vias.

Contudo, a efetividade das técnicas de microestimulação, apesar de serem desenvolvidas

para produzir uma ativação neural reprodutível e com mínimo dano tecidual (Tehovnik, 1996), não depende apenas do alvo neural escolhido. Basicamente, a magnitude e a extensão dos substratos neurais recrutados dependem de fatores tais como a propagação da corrente (cuja intensidade, a partir da extremidade do eletrodo, cai com o quadrado da distância) e a excitabilidade do substrato neural estimulado (Ranck, 1975). Além disso, vale ressaltar que sua eficácia depende da configuração e arquitetura do estímulo. Parâmetros como polaridade (Tehovnik, 1996), amplitude (µA) (Cutrell e Marrocco, 2002), frequência (Hz) (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009; So *et al.*, 2011) e organização temporal dos pulsos (intervalos inter-estímulo - IPIs) podem ter efeitos modulatórios muito distintos sobre as redes neurais estimuladas (Cota *et al.*, 2009; Quinkert *et al.*, 2010; Mesquita *et al.*, 2011; So *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2012).

Em um estudo de Ressonância Magnética Funcional, resultados do nosso grupo demonstraram que a microestimulação do complexo amigdaloide, com padrões temporais arquitetados com distintos IPIs, podem ativar estruturas secundárias também distintas (hipocampo e núcleo *accumbens*) (Mesquita et al., 2011) (FIGURA 10). Além disso, mesmo em uma rede neural disfuncional, como é o caso da epilepsia, os padrões temporais inter-estímulo podem modular circuitos epileptogênicos com consequências tanto pró quanto anti-convulsivantes (Cota et al., 2009).

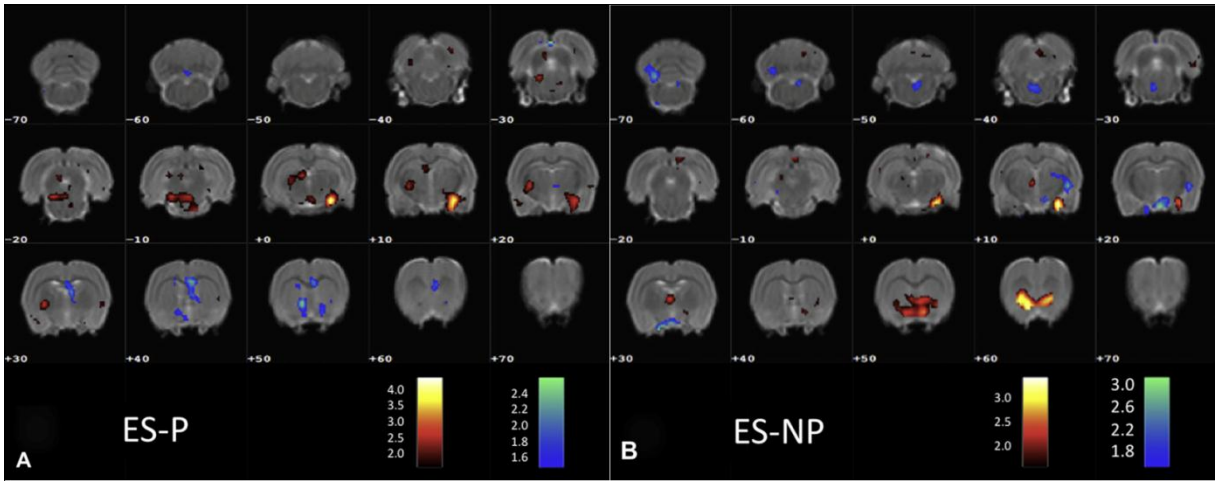


FIGURA 10: Ressonância magnética funcional. Mapa da estatística paramétrica para os grupos que receberam padrões temporais distintos de microestimulação elétrica. **A,** grupo com padrão definido como periódico (ES-P - 4 Hz, com intervalo inter-estímulo fixo). **B,** padrão definido como não periódico (ES-NP - 4 Hz com intervalo inter-estímulo randômico). As cores codificam valores estatísticos que variam do vermelho escuro para o amarelo ($p < 0,05$), quando a atividade da respectiva área aumenta. As cores que variam de azul para verde representam estruturas hipoativas. Pode ser observada ativação semelhante (vermelho e amarelo) para o complexo amigdaloide em ambos os casos (região de inserção do eletrodo), contudo o padrão definido como periódico produziu uma ativação contralateral ao longo de estruturas como o tálamo e hipocampo, uma vez que o padrão definido como não periódico promoveu uma ativação de estruturas como córtex frontal anterior e núcleo *accumbens*.

1.3 COMPLEXO AMIGDALOIDE – ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS

"Em um ser vivo, é notório o valor adaptativo de um sistema. Sistema este capaz de detectar ameaças e recompensas ambientais e rapidamente organizar respostas comportamentais para evitar tais ameaças, garantir as recompensas e aumentar ainda mais a possibilidade de sobrevivência"

CASTRO, G. P. , 2007

O termo amígdala (derivado da palavra em latim para "amêndoa") foi cunhado em 1819 por Karl Friedrich Burdach para descrever a matéria cinzenta subcortical encontrada rostralmente ao hipocampo, no lobo temporal medial (Whalen e Phelps, 2009). É uma estrutura complexa que compreende diversos agrupamentos (núcleos e subnúcleos) celulares (Sah *et al.*, 2003). Embora estes agrupamentos sejam diferenciados com base em sua citoarquitetura (Krettek e Price, 1978), são evolutivamente preservados em todos os vertebrados, apresentando grande semelhança morfológica e funcional entre algumas espécies de mamíferos (Price *et al.*, 1987; Mcdonald, 1998). Em roedores, mais especificamente nos ratos, o complexo amigdaloide pode ser subdividido em três grandes núcleos, de acordo com as classificações comumente aceitas: complexo basolateral ou profundo, que se subdivide em núcleo lateral, núcleo basal e núcleo basal acessório; cortical ou superficial (*cortical-like group*), que se subdivide em núcleo cortical e núcleo do trato olfatório lateral; centro medial, que se subdivide em núcleo medial e núcleo central. Incluem-se ainda alguns outros núcleos, dificilmente caracterizados dentre os três maiores citados acima, definidos como conjunto de células intercalares e área amígdala-hipocampal (Price *et al.*, 1987; Mcdonald, 1998; Sah *et al.*, 2003; Ledoux, 2007) (FIGURA 11 e 12).

O complexo amigdaloide apresenta-se internamente arquitetado com vias sinápticas precisamente organizadas. Consideram-se três distintos níveis de conectividade, definidos como: internuclear, com conexões entre dois núcleos; interdivisional, com conexões entre os subnúcleos; intradivisional, onde cada subnúcleo apresenta suas próprias conexões. Os diferentes núcleos e subnúcleos representam distintas unidades funcionais e processam o fluxo de informações com elevado padrão organizacional de comunicação (Pitkanen *et al.*, 1997).

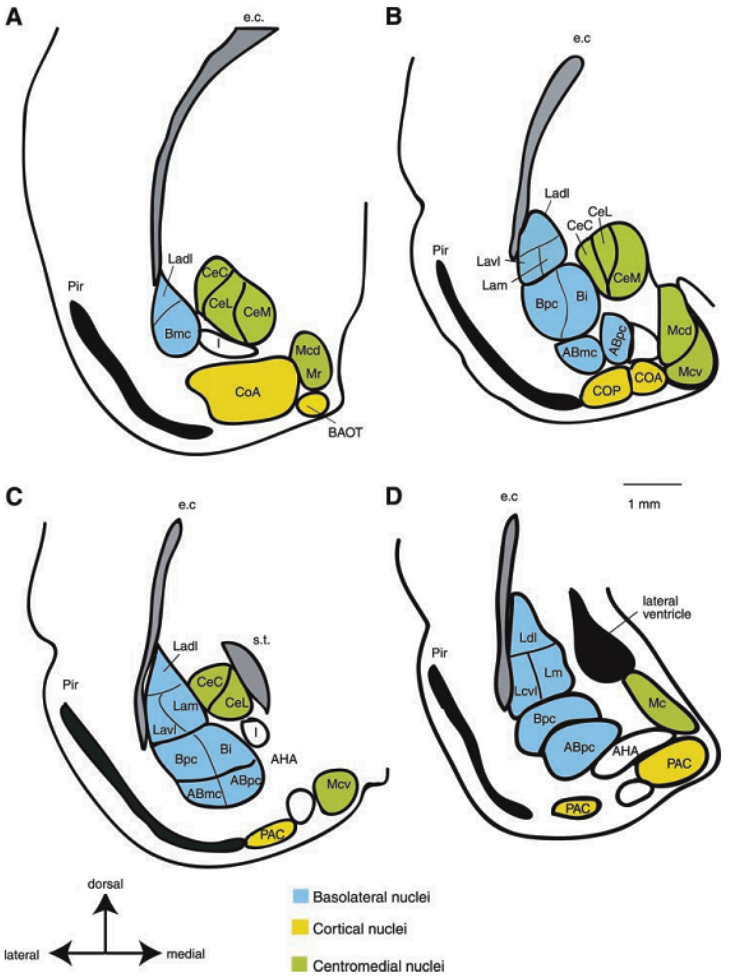


FIGURA 11: Núcleos do Complexo Amigdaloide de um rato. Cortes coronais – **(A)** Rostral → **(D)** Caudal. Áreas em azul formam o Complexo Basolateral, áreas em amarelo formam o núcleo cortical e áreas em verde o núcleo Centromedial. LDL: Amígdala Dorsolateral; LM: Amígdala Lateral; ABmc: Subdivisão Magnocelular do Núcleo Basal; Ladl: Subdivisão Dorsolateral da Amígdala Lateral; Lam: Subdivisão Lateral da Amígdala Medial; Lavl: Subdivisão Ventrolateral Anterior da Amígdala Lateral; Lcvl: Subdivisão Ventrolateral Caudal da Amígdala Lateral; Bmc: Amígdala Magnocelular; Bi: Amígdala Basal Intermediária; Bpc: Amígdala Basal Parvocelular; ABpc: Amígdala Basal Parvocelular Acessória; CeM: Amígdala Central Medial; CeC: Amígdala Central Capsular; CeL: Amígdala Central Lateral; Mcd: Subdivisão Dorsal da Amígdala Medial; Mcv: Subdivisão Ventral da Amígdala Medial; Mr: Subdivisão Rostral da Amígdala Medial; PaC: Córtex Peri-amigdaloide; Coa: Núcleo Cortical Anterior; Cop: Núcleo Cortical Posterior; Baot: Núcleo do Trato Olfatório Acessório; Nlot: Núcleo do Trato Olfatório Lateral; AHA: Area Amígdalo-Hipocampal; I: Núcleo Intercalado; Pir: Córtex Piriforme; s.t.: Estria Terminal; e.c.: Cápsula Externa (adaptado de: Poucet e Save, 2005).

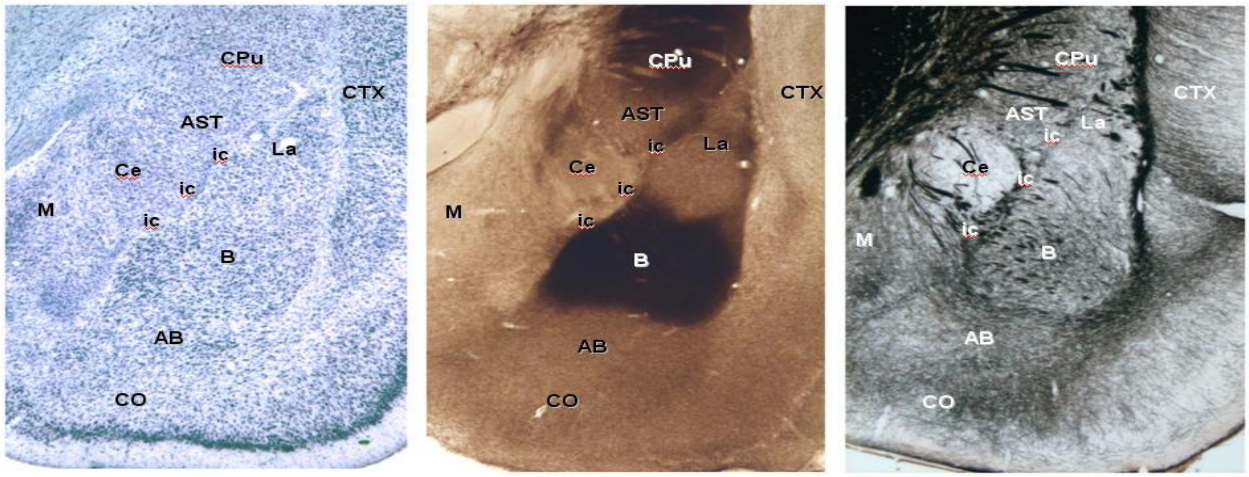


FIGURA 12: Complexo Amigdaloide. Diferentes métodos de marcação. **Painel esquerdo:** corpos celulares marcados com *Nissl*; **Painel central:** marcação com acetilcolinesterase; **Painel direito:** fibras marcadas com prata. AB: Basal Acessório; B: Basal; Ce: Central; Itc: Células Intercaladas; La: Lateral; M: Medial; CO: Cortical, AST: área de transição Amígdalo-Estriatal; CPu: Caudato Putamen; CTX: Córtex (adaptado de: Ledoux, 2007).

Sendo uma estrutura caracteristicamente polimodal, inúmeras são as projeções que o Complexo Amigdaloide realiza junto a regiões corticais e subcorticais (Pitkanen *et al.*, 1997; Mcdonald, 1998). Baseado nesse grande fluxo de informação, as projeções aferentes e eferentes podem ser basicamente separadas em: conexões com estruturas corticais e talâmicas e conexões com hipotálamo e tronco cerebral (Sah *et al.*, 2003).

Enquanto as aferências hipotalâmicas e do tronco cerebral carreiam informações dos sistemas autonômicos, envolvidas com respostas comportamentais inatas, as conexões corticais e talâmicas carreiam prioritariamente informações sensoriais e relacionados à memória (Mcdonald, 1998). As projeções corticais são glutamatérgicas e originam-se predominantemente de neurônios piramidais da camada V (Ottersen *et al.*, 1986; Amaral e Insausti, 1992) e em grande parte são ipsilaterais, passando pela cápsula externa (Mascagni *et al.*, 1993).

Especificamente, nas conexões córtico-amigdalares de mamíferos, observa-se que: 1) o complexo amigdaloide recebe informações visuais, auditivas e somatossensórias provenientes de vias de processamento córtico-cortical, específicas para cada modalidade sensorial, originadas nos respectivos córtices primários e que seguem para áreas associativas com maior complexidade de processamento; 2) as projeções para a amígdala, advindas dos substratos mais caudais, são mais densas que as provenientes dos substratos mais rostrais; 3) as projeções das áreas de processamento polimodal, como o córtex pré-frontal, perirrinal e o hipocampo, também exercem importante papel modulatório no processamento feito pelo complexo amigdaloide; 4) informações olfativas, gustatórias e viscerais que alcançam a amígdala são provenientes de um estágio de processamento cortical inferior ao das demais modalidades (Mcdonald, 1998; Sah *et al.*, 2003).

O complexo amigdaloide, por sua vez, apresenta uma grande densidade de projeções para regiões corticais, hipotalâmicas e para o tronco cerebral. De forma geral, as projeções para regiões corticais sensoriais partem dos núcleos corticais e do complexo basolateral. O córtex perirrinal, juntamente com áreas do córtex frontal que projetam para a amígdala, recebe conexões recíprocas dos núcleos lateral, basal, basal acessório, medial e do córtex periamigdaloide (Pitkanen *et al.*, 1997; Sah *et al.*, 2003). Os núcleos corticais, que recebem todas as projeções olfatórias, enviam projeções substanciais e recíprocas de volta para o córtex olfatório. O complexo basolateral apresenta robustas projeções para os sistemas de memória no lobo temporal medial, com aferências para o hipocampo e córtex perirrinal (Petrovich *et al.*, 2001), além de projeções para o núcleo *accumbens*, caudado-putamem e núcleos da estria terminal (Mcdonald, 1991).

Quanto aos núcleos centrais, a sua subdivisão medial apresenta maciças projeções tanto para o hipotálamo quanto para núcleos da estria terminal (Dong *et al.*, 2001), núcleos do tronco-cerebral, ponte e medula (Veening *et al.*, 1984). As projeções para o tronco cerebral podem ser divididas de acordo com três principais alvos: 1) substância cinzenta periaquedutal, (capaz de gerar vocalizações, sobressaltos, analgesia e alterações cardiovasculares) (Rizvi *et al.*, 1991; Behbehani, 1995); 2) núcleo parabraquial (vias responsáveis pela dor) (Moga *et al.*, 1990; Gauriau e Bernard, 2002); 3) núcleo do trato solitário e motor dorsal do vago (Van Der Kooy *et al.*, 1984).

Como demonstrado na descrição acima, o grande conjunto de conexões sinápticas do complexo amigdaloide integra informações sensoriais polimodais correlacionadas a diferentes condições ambientais e ao processamento cortical de áreas associativas. Essas características funcionais justificam, de certa forma, o seu reconhecido papel mnemônico e emocional (Rogan e Ledoux, 1996).

Baseadas em trabalhos realizados em humanos (Vuilleumier *et al.*, 2001; 2003; Larson *et al.*, 2006) e em ratos (Ledoux, Farb*, et al.*, 1990; Romanski *et al.*, 1993), evidências demonstram que a amígdala integra primordialmente duas rotas de processamento de informação. Vias corticais provêem a amígdala com informações com alto grau de processamento, enquanto as vias talâmicas (subcorticais) carreiam informações menos elaboradas, mas com uma aparente vantagem temporal de processamento (Morris *et al.*, 1998).

Uma variedade de diferentes funções tem sido atribuída ao complexo amigdaloide, incluindo processamentos relativos à memória (Hamann, 2001; Mcgaugh, 2002; Pare *et al.*, 2002), atenção (Gallagher e Holland, 1994), emoção e significância emocional de estímulos sensórios (Aggleton e Mishkin, 1985; Aggleton, 1993; Rogan e Ledoux, 1996; Ledoux, 2000; Adolphs, 2002; Ledoux, 2003) e percepção de movimentos corporais (Bonda *et al.*, 1996).

No entanto, a função mais amplamente investigada tem sido a contribuição da amígdala em processos emocionais, particularmente na detecção de eventos emocionalmente relevantes e na geração de diferentes respostas biológicas (Rogan e Ledoux, 1996).

O complexo amigdaloide tem sido especialmente relacionado ao medo e ao condicionamento ao medo (FIGURA 13). Essas respostas são caracterizadas pela ativação de sistemas autônomos e hormonais que geram comportamentos de fuga/luta, como congelamento (*freezing*), sobressaltos, liberação de hormônios relacionados ao *stress* e mudanças na pressão sanguínea e na frequência cardíaca (Ledoux *et al.*, 1988; Ledoux, Cicchetti*, et al.*, 1990; Davis,

1992; Campeau e Davis, 1995; Rogan e Ledoux, 1996; Rogan *et al.*, 1997; Ledoux, 2000; Ledoux, 2003; 2007).

Mais especificamente, o complexo basolateral é responsável pela comparação e desenvolvimento de associações entre estímulos condicionados e não condicionados em tarefas de condicionamento clássico que resultam no condicionamento ao medo (Ledoux, Cicchetti*, et al.*, 1990; Romanski *et al.*, 1993; Buchel e Dolan, 2000; Ledoux, 2000; Blair *et al.*, 2005). O complexo basolateral ativa o núcleo central, que induz respostas autonômicas pela estimulação de grupos de neurônios no tronco cerebral ou de núcleos hipotalâmicos (Ledoux *et al.*, 1988; Ledoux, Cicchetti*, et al.*, 1990).

Alguns trabalhos afirmam que a amígdala possui um perfil computacional mais amplo, sendo importante não só para o processamento de informações em situações aversivas, como mencionado acima, mas também para tomadas gerais de decisão, aquisição e processamento de aspectos recompensatórios de eventos (Sander *et al.*, 2003). Evidências demonstram que o complexo basolateral tem um papel crucial na aprendizagem emocional, independente da valência. Suas projeções excitatórias para regiões do estriado ventral, como o núcleo *accumbens* (Christie *et al.*, 1987; Brog *et al.*, 1993), são capazes de modular comportamentos positivamente motivados pro busca de recompensas (Cador *et al.*, 1989; Mclaughlin e Floresco, 2007; Ambroggi *et al.*, 2008; Tye *et al.*, 2008; Shiflett e Balleine, 2010)

Portanto, esse amplo espectro de estímulos e eventos de diferentes valências, para cujo processamento a amígdala contribui, sugere que essa estrutura funciona como um detector de relevância. Um evento é considerado relevante para um organismo quando influencia significativamente, de forma negativa ou positiva, a manutenção da sobrevivência ou a conquista de um objetivo qualquer (Davis e Whalen, 2001).

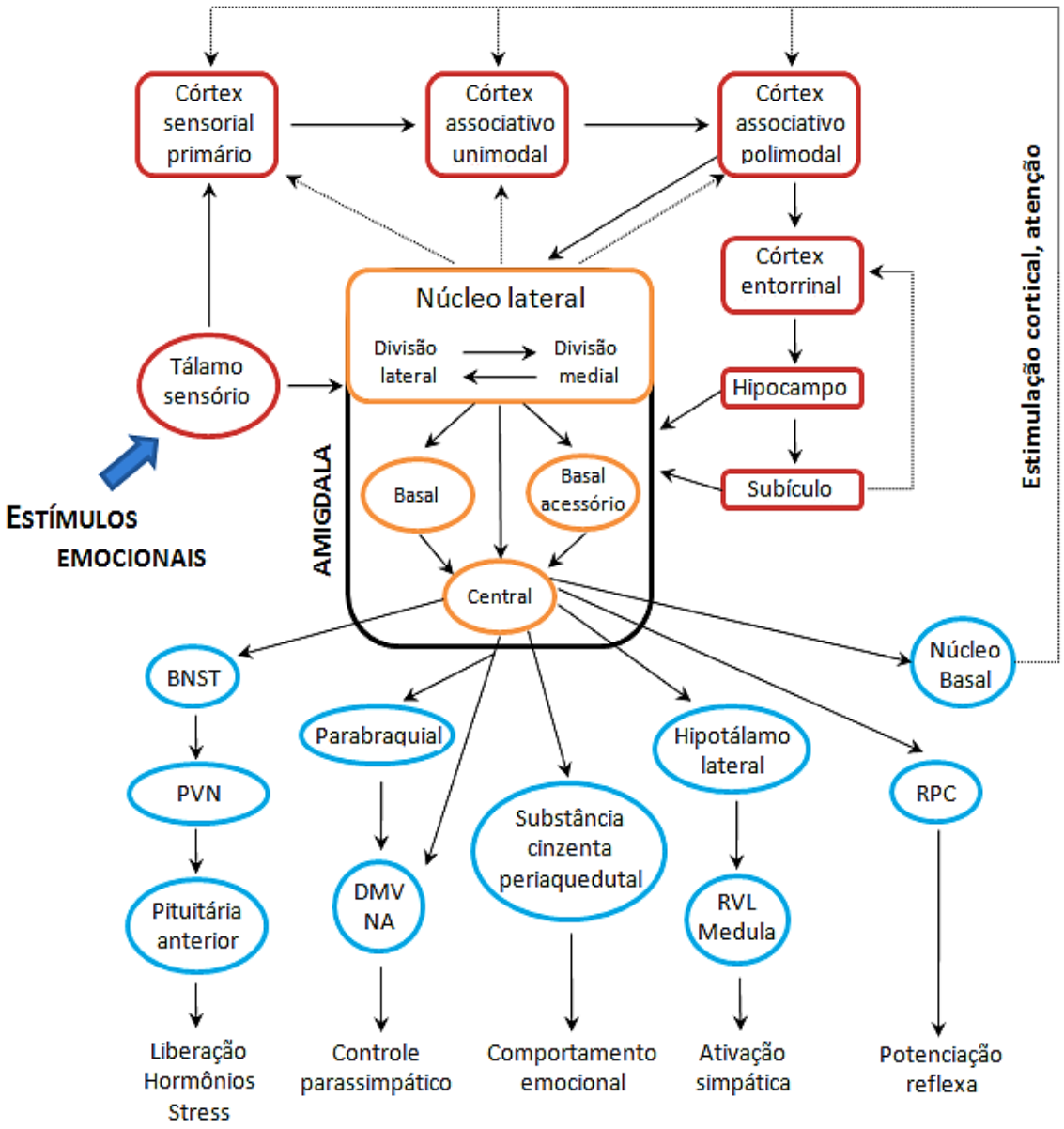


FIGURE 13: Esquema do circuito de condicionamento ao medo: Hierarquia das informações sensoriais que convergem sobre o Núcleo Lateral da Amígdala. Através das conexões intraamígdalares a saída do Núcleo Lateral é transmitida ao Núcleo Central, que controla vários sistemas efetores envolvidos na expressão de respostas emocionais. As projeções são indicadas por setas cheias e as alças de retroalimentação são indicadas por setas tracejadas. BNST: Núcleo Basal da Estria Terminal; DMV: Núcleo Motor Dorsal do Vago, NA: Núcleo Ambíguo; RPC: Núcleo Reticular Ponto Caudal; RVL: Núcleo Ventrolateral Rostral da Medula; PVH: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (adaptado de: Rogan e Ledoux, 1996).

2. JUSTIFICATIVA

Dando continuidade às linhas de pesquisa desenvolvidas no Núcleo de Neurociências (NNC-UFMG/ www.nnc.ufmg.br) quanto à dinâmica temporal das redes neurais, o presente trabalho apresenta como hipótese central que: **"PADRÕES TEMPORAIS DE MICROESTIMULAÇÃO ELÉTRICA SÃO CAPAZES DE CARREAR INFORMAÇÕES"**.

De fato, padrões de microestimulação elétrica temporalmente codificados (com uma taxa fixa de estímulos por segundo, mas com IPIs variados), quando aplicados no complexo amigdalóide, promovem a ativação de distintas estruturas secundárias (Mesquita *et al.*, 2011). Além disso, em redes neurais disfuncionais, como é o caso da epilepsia, os padrões temporais com diferentes IPIs podem modular circuitos epileptogênicos com consequências tanto pró quanto anti-convulsivas (Cota *et al.*, 2009).

Ainda no âmbito da epilepsia, vale ressaltar que quando um padrão de estimulação elétrica é aplicado no complexo amigdaloide, mesmo com IPI fixo, mas arquitetado com configurações mínimas de estimulação (0,5 Hz, ondas quadradas com duração de 100 µs), o sincronismo entre distintas áreas cerebrais pode ser programado. Em resumo, circuitos reverberantes de grandes substratos neurais são capazes de sincronizar-se temporalmente com o padrão aplicado, passando a oscilar com a mesma frequência do estímulo utilizado (Medeiros *et al.*, 2014). Nesse sentido, a microestimulação elétrica apresenta-se como uma ferramenta muito interessante no estudo das redes neurais reverberantes, causando perturbações que não podem ser explicadas apenas pela amplitude e/ou frequência do estímulo elétrico aplicado.

Evidências da importância do sincronismo entre estruturas cerebrais, por exemplo em processos de aprendizagem e memória, têm sido largamente discutidas na literatura (Fell e Axmacher, 2011). De acordo com outros resultados do nosso grupo, quando um estímulo sonoro de estado estável (*steady state*) adquire uma relevância biológica, após um paradigma de condicionamento ao medo, a atividade registrada no Colículo Inferior (estrutura responsável por estágios iniciais do processamento auditivo) apresenta significativas modificações, tanto na estrutura temporal quanto na amplificação das respostas. Essas evidências reiteram a importância funcional do sincronismo temporal em diferentes substratos (*resultados em processo de publicação*). Vale ressaltar que, em tarefas de condicionamento ao medo, o complexo amigdaloide, além de participar ativamente do processo associativo, participa da modulação das respostas emocionais. Essa modulação advém da contínua troca de informações, através da grande densidade

de projeções, junto aos substratos límbicos (Ledoux, Farb*, et al.*, 1990).

Na literatura, um número escasso de trabalhos utilizou a microestimulação elétrica temporalmente codificada para modular as redes reverberantes. Na grande maioria, a codificação do estímulo foi realizada a partir de uma frequência fixa, mas com IPI variados, sem configurar um padrão temporal bem definido (Kimmel e Moore, 2007; Cota *et al.*, 2009; Quinkert *et al.*, 2010; Mesquita *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2012). Dentre esses trabalhos, Quinkert et al. (2010), demonstraram que a temporização dos padrões de estimulação não é inócua quando aplicada em regiões associativas polimodais, no caso o hipocampo. De acordo com esses resultados, o padrão temporal aleatório foi capaz de alterar a atividade cerebral, avaliada através da atividade motora exploratória e da energia dos sinais eletrofisiológicos registrados (LFP). De qualquer forma, os autores admitem que a configuração de um padrão de estimulação tende a ser importante, mas essas características ainda não foram devidamente exploradas (Quinkert *et al.*, 2010).

As evidências da codificação neural através do sincronismo temporal estão basicamente fundamentadas em registros eletrofisiológicos de respostas evocadas a partir de estímulos físicos ambientais, realizados durante tarefas comportamentais (Singer, 1993; Engel *et al.*, 2001; Fries, 2005; Maldonado *et al.*, 2008; Singer, 2009). Contudo, o processo inverso, baseado na microestimulação elétrica temporalmente codificada, ainda não foi utilizado como uma forma de carrear uma informação e possivelmente codificar uma rede neural. De forma a por ventura, desencadear o aparecimento de diferentes estados de funcionamento cerebral.

Em resumo, baseado nas premissas da codificação temporal (Singer, 1993; 1999a; b; 2009), propomos que padrões temporais específicos de microestimulação elétrica, quando associados a diferentes valências ambientais, serão capazes de desencadear o surgimento de diferentes estados de funcionamento cerebral. Esses padrões serão aplicados necessariamente em uma região polimodal (Mesquita *et al.*, 2011), codificados a partir de um número constante de pulsos (10bins, com latências de 10ms) (Engel e Singer, 2001) e representados por sequências binárias de 0's (sem estímulo) e 1's (um pulso) (Mcculloch e Pitts, 1943).

A representação binária, baseada no modelo teórico de aprendizagem *Adaptive Ressonance Theory* (Grossberg, 1980; 1999), mimetizaria uma comunicação serial assíncrona, linguagem de transmissão computacional comum, onde um conjunto de sequências binárias pode representar um pacote de informações.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar se padrões temporais de microestimulação elétrica aplicados no complexo basolateral da amígdala podem ser associados a uma valência ambiental relevante e porventura discriminados, através de um paradigma de aprendizado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 1

- Projetar e implementar dispositivos eletrônicos capazes de gerar padrões temporais de microestimulação elétrica.
- Projetar e implementar sistemas de *hardware* e *software* para realização dos paradigmas de aprendizado.

- Realizar um paradigma de condicionamento clássico ao medo, utilizando como estímulo condicionado, um **Padrão periódico** (6 pulsos temporalmente fixos, **6 Hz**, IPIs fixos) de microestimulação elétrica, de forma a validar duas premissas:
    - a microestimulação do complexo basolateral da amígdala por si só não é capaz de induzir uma resposta comportamental aversiva;
    - uma vez pareado a um estímulo não condicionado (**US**, choque na pata, 0,4mA) torna-se um estímulo condicionado capaz de desencadear uma resposta comportamental condicionada significativa (*Freezing* ou congelamento - robusta resposta comportamental de fuga ou luta relacionada a memória de medo).

OBJETIVO ESPECÍFICO 2

- Realizar um paradigma discriminatório de condicionamento ao medo e analisar se distintos padrões temporais de microestimulação elétrica (**Padrão A** - 1001111001 e **Padrão B** - 1110000111), aplicados como estímulos condicionados, podem ser discriminados e associados a um estado cerebral relacionado à memória aversiva (avaliado pelo comportamental condicionado de *freezing*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SETUP DE MICROESTIMULAÇÃO

Em nosso laboratório desenvolvemos sistemas eletrônicos capazes de gerar diferentes padrões de microestimulação elétrica (APENDICE) (FIGURA 15B).

Para a realização dos paradigmas de condicionamento clássico, foram configuradas trilhas de áudio no formato **.wav*, com diferentes IPIs, em programas de produção e gravação de áudio. Quando tocadas em um computador ou em dispositivos móveis de reprodução, os sinais foram direcionadas para um circuito acionador (*trigger).* Esse circuito é capaz de gerar pulsos quadráticos, com tensão fixa de 5 V e comprimentos de onda variáveis.

Os sinais produzidos pelo *trigger* foram direcionados a um gerador comercial de corrente elétrica (DIGITIMER Ltd – *Isolated Stimulator Model DS3 with Constant Current output*) que gera pulsos quadrádos, monofásicos, positivos com amplitude e comprimento de onda programáveis.

A maioria dos protocolos de microestimulação elétrica utiliza pulsos bifásicos, compostos por sinais de corrente catódica e anódica de igual duração. A configuração bifásica permite que pouca ou nenhuma carga seja entregue, reduzindo assim o dano eletrolítico ao tecido estimulado (Tehovnik, 1996).

Dessa maneira, uma vez que o gerador de corrente emite apenas pulsos monofásicos, positivos, o sinal de *trigger* e a corrente monofásica produzida pelo gerador foram direcionados a outro circuito. Este, por sua vez, foi idealizado para que a cada dois pulsos elétricos um deles fosse invertido. Assim, cada pulso de *trigger* (o mesmo que aciona o gerador de corrente) aciona também o circuito *inversor*, gerando um pulso bifásico.

4.2 PADRÕES TEMPORAIS DE MICROESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

Considerando que a atividade de neurônios corticais e subcorticais pode sincronizar-se com grandes osciladores, em janelas de coincidência de aproximadamente 5 - 10 ms (Engel e Singer, 2001), os padrões foram codificados com 10 bins, com IPI de 10 ms. Ainda considerando um período de oscilação de uma rede ressonante por volta de 100 ms a 300 ms (Dehaene e Changeux, 2011), ou seja de 4 a 10 Hz, o padrão foi composto por um período total de 100 ms.

Dessa maneira, caso associado a um grande oscilador, poderia carrear uma informação completa. A sincronização de osciladores dentro da referida faixa de frequência (atividade em *Teta*) representa um dos mecanismos primordiais para a plasticidade sináptica em substratos neurais relacionados a memória de medo condicionado (Seidenbecher *et al.*, 2003).

De acordo com o modelo proposto, codificamos dois diferentes padrões, ambos compostos por seis pulsos e que se diferem apenas em sua organização temporal:

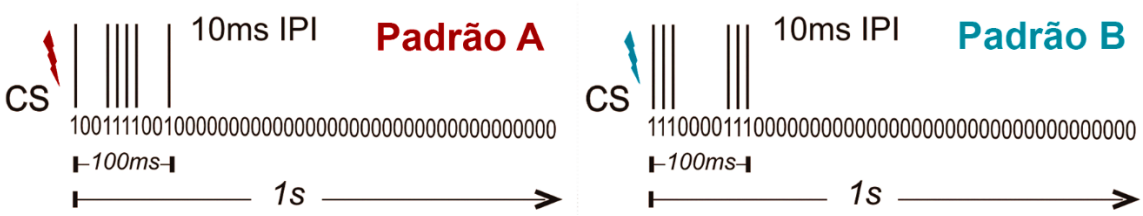


FIGURA 14: Padrões temporais de microestimulação elétrica. Padrão A - 1001111001 e **Padrão B** -1110000111.

Cada pulso consistiu de ondas quadradas bifásicas de 25 µA com duração de 100 µs. Uma vez que os padrões foram representados por sequências binárias, com o mesmo número de 0's (sem estímulo) e 1's (um pulso), temporalmente distribuídos, eles poderiam ser considerados como duas informações diferentes.

4.3 SUJEITOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus albinus Wistar*) pesando entre 250 – 310 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da 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 (Purina®) e água *ad libitum.* Durante todo o período, permaneceram alocados em gaiolas com temperatura ambiente controlada de ±22 ºC e foto período de 12 h claro / escuro. Esforços foram realizados para evitar qualquer sofrimento desnecessário aos animais. Todos os experimentos propostos foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A metodologia proposta foi aprovada por essa comissão sob o número de protocolo **12/2013**.

4.4 CIRURGIA PARA IMPLANTE DE ELETRODOS

Os animais foram anestesiados com uma solução de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) intraperitoneal e localmente na região do escalpo com uma solução de Cloridrato de Lidocaína + Epinefrina (2%), sendo então submetidos à cirurgia estereotáxica (Estereotáxico *Stoelting Co, Wood Dale*, IL, USA). Eletrodos bipolares (1 mm de ponta a ponta), construídos a partir de um par trançado de fios de aço inoxidável com revestimento de teflon (Modelo: 791400, *A-M Systems Inc., Carlsborg*, WA, USA) (FIGURA 15C), foram cirurgicamente implantados no complexo basolateral da amígdala direita (referência: AP: -2.8 mm e LL: -4.8 mm a partir do bregma e DV: -9.4 mm a partir da dura-máter) (Paxinos e Watson, 2007). O eletrodo foi fixado no crânio com cimento de zinco e soldado em um conector de telefone (RJ11 4 pinos) que, por sua vez, foi fixado no crânio com acrílico (FIGURA 15A). Ao final, os animais foram tratados profilaticamente com solução pentabiótica (19 mg/kg) e anti-inflamatória (Flunixin, 5 mg/kg) intramusculares, seguindo um período de recuperação de 5 a 7 dias.

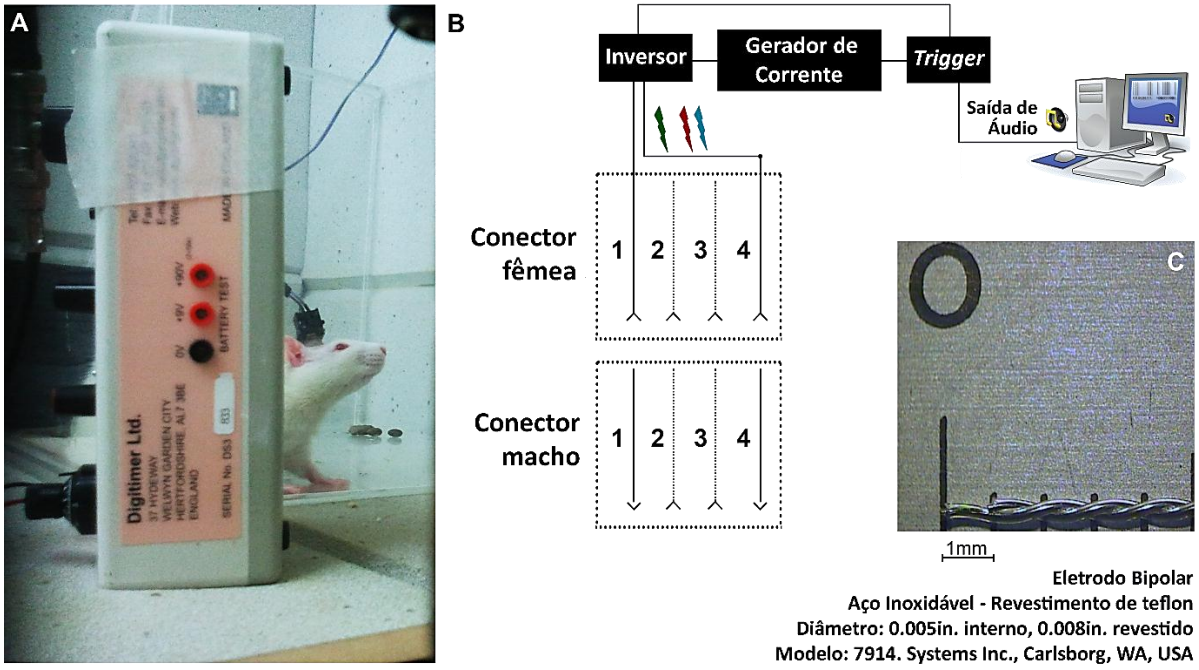


FIGURA 15: Setup experimental. A, B. Animal conectado ao sistema de microestimulação. **C.** Eletrodo bipolar (aço inoxidável com revestimento de teflon. Modelo: 791400, *A-M Systems* Inc., Carlsborg, WA, USA).

4.5 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 continuas mudanças impostas pelo ambiente (Kim e Jung, 2006).

As bases anatômicas, celulares e moleculares relacionadas ao medo foram largamente estudadas através de tarefas comportamentais, como o condicionamento clássico ou Pavloviano (Rogan e Ledoux, 1996; Ledoux, 2000; Ledoux, 2003; Kim e Jung, 2006). No condicionamento ao medo Pavloviano, um estímulo emocionalmente neutro ou inócuo (condicionado, CS) é apresentado em conjunto (pareado) a um estímulo aversivo (não condicionado, US) (FIGURA 16). Esse estímulo aversivo, por sua vez, ativa de forma reflexa respostas não condicionadas, inatas, de fuga ou luta (Watson e Rayner, 1920; Rescorla, 1968). Após um ou diversos pareamentos entre CS-US, uma robusta memória associativa é criada, tornando CS capaz de desencadear as mesmas respostas reflexas que tipicamente ocorreriam na presença do perigo (Kim e Jung, 2006).

Paradigmas de condicionamento clássico ao medo tipicamente utilizam pequenos animais (ratos, camundongos ou coelhos) como sujeitos experimentais. Em contingências bem controladas e preestabelecidas, o pareamento temporal entre estímulos condicionados (contexto, luz ou som) e estímulos não condicionados (choque na pata) gera robustas respostas condicionadas (Ledoux, 2003; Kim e 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 facilmente analisadas através de respostas comportamentais estereotipadas (Blanchard e Blanchard, 1969b; a; Blanchard e Blanchard, 1972; Bouton e Bolles, 1980; Fanselow, 1984) ou por técnicas mais refinadas como imunohistoquímica/fluorescência e eletrofisiologia (Pezzone *et al.*, 1992; Rogan e Ledoux, 1996; Rogan *et al.*, 1997).

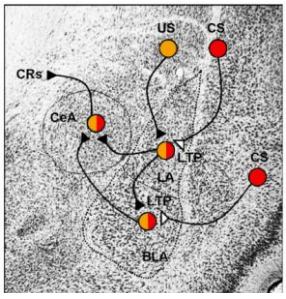


FIGURA 16: Potenciação de longa duração. **A.** Pareamento de um estímulo condicionado (CS, luz ou som) com um estímulo não condicionado (US, choque na pata). B. Potenciação de longa duração (LTP). CS e US entram na amígdala por vias sensórias no núcleo lateral e basolateral. Após associação e potenciação entre CS-US os sinais são direcionados ao núcleo central que envia projeções para centros autonômicos e locomotores envolvidos nas respostas condicionadas (CRs) (Adaptado de: Rogan e Ledoux, 1996; Ledoux, 2000; Kim e Jung 2006).

4.5.1 PARADIGMAS DE CONDICIONAMENTO AO MEDO

Todos os paradigmas foram conduzidos durante o período claro do ciclo sono-vigília dos animais. Dois diferentes contextos foram preparados, um para a fase de pré-condicionamento (CS inócuo) e teste de retenção (reapresentação de CS) e outro para a fase de condicionamento (associação entre CS-US). A fase de pré-condicionamento e teste de retenção foram realizadas em uma caixa de acrílico transparente (30x30x30cm), aromatizada com solução de álcool 70%, em um ambiente acusticamente isolado. A fase de condicionamento foi realizada em um novo ambiente, de modo a evitar influencias contextuais. Nesse sentido, os animais foram posicionados em uma outra caixa com as laterais de plástico cinza (23x23x25cm), aromatizada com solução de ácido acético 1%, o piso composto por grades metálicas (Insight®) e o forro superior preto.

4.5.1.1 PARADIGMA DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AO MEDO

Para o primeiro paradigma, utilizamos como estímulo condicionado um **Padrão Periódico** de microestimulação. Este padrão foi composto por 6 pulsos temporalmente fixos (**6Hz**), apresentados durante três diferentes fases, ao longo de três dias consecutivos:

1º dia) Fase de pré-condicionamento

2º dia) Fase de condicionamento

3º dia) Teste de retenção

Em todas as fases, os animais foram ligados ao sistema de microestimulação, posicionados na caixa e submetidos a um período de cinco minutos de habituação contextual.

Durante a fase de pré-condicionamento e teste de retenção, todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de estimulação, que consistiu da aplicação do **Padrão Periódico** por 5s, apresentado por 5 vezes, aleatoriamente ao longo do tempo (Latência entre as aplicações de 1 a 3min).

Durante a fase de condicionamento, os animais foram divididos em dois grupos e estimulados da seguinte maneira:

1) **Pareado:** Estímulo não condicionado (**US**-choque na pata, 0,4mA) pareado com o **Padrão Periódico** (n=5).
2) **Não Pareado:** Estímulo não condicionado (**US**-choque na pata, 0,4mA) não pareado com o **Padrão Periódico** (n=5).

O estímulo não condicionado foi aplicado por 5 vezes no grupo pareado, concomitantemente ao estímulo condicionado, nos 2 s finais da janela de 5 s de microestimulação. Para o grupo não pareado, o estímulo não condicionado também foi aplicado 5 vezes, mas aleatoriamente, de forma a nunca se sobrepor ao estímulo condicionado (latência mínima de 20 s com a janela de 5 s de microestimulação) (FIGURA 17B).

4.5.1.2 PARADIGMA DISCRIMINATÓRIO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO

Para o segundo paradigma, utilizamos como estímulos condicionados duas sequencias binárias (**Padrão A** - 1001111001 e **Padrão B** - 1110000111), também compostas por 6 pulsos, que se diferiram apenas em sua organização temporal. Ambos foram apresentados durante 3 diferentes fases ao longo de cinco dias consecutivos:

1º dia) Fase de pré-condicionamento
2º dia) Fase de condicionamento
3º ao 5º dia) Teste de retenção

Assim como no primeiro paradigma, em ambas as fases, os animais foram ligados ao sistema de microestimulação, posicionados na caixa e submetidos a um período de cinco minutos de habituação contextual.

Durante a fase de pré-condicionamento, todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de estimulação, que consistiu na aplicação randomizada de ambas as sequências binárias. Cada sequência foi apresentada por 5 s (uma apresentação por segundo), 5 vezes, aleatoriamente ao longo do tempo (Latência entre as aplicações de 1 a 3min).

Durante a fase de condicionamento, os animais foram divididos em três grupos e estimulados da seguinte maneira:

1) **Pareado A**: estímulo não condicionado (**US**, choque na pata, 0,4mA) pareado com o **Padrão A** e não pareado com o **Padrão B** (n=6).
2) **Pareado B**: estímulo não condicionado (**US**, choque na pata, 0,4mA) pareado com o **Padrão B** e não pareado com o **Padrão A** (n=8).
3) **Não Pareado**: estímulo não condicionado (**US**, choque na pata, 0,4mA) não pareado a nenhum dos estímulos condicionados (n=6).

Novamente, o estímulo não condicionado foi aplicado por 5 vezes nos grupos pareados, concomitantemente ao estímulo condicionado, nos 2 s finais da janela de 5 s de microestimulação. Para o grupo não pareado, o estímulo não condicionado também foi aplicado 5 vezes, aleatoriamente, de forma a nunca se sobrepor ao estímulo condicionado (latência mínima de 20 s com a janela de 5 s de microestimulação).

Os testes de retenção foram realizados por três dias consecutivos de forma que, para ambos os grupos, apenas uma sequência binária foi apresentada por dia. Da mesma maneira, cada sequência foi apresentada por 5 s (uma apresentação por segundo), 5 vezes, aleatoriamente ao longo do tempo (1 a 3min) sendo: **Dia 1** - **Padrão B**; **Dia 2** - **Padrão A**; **Dia 3** - **Padrão B** (FIGURA 17C).

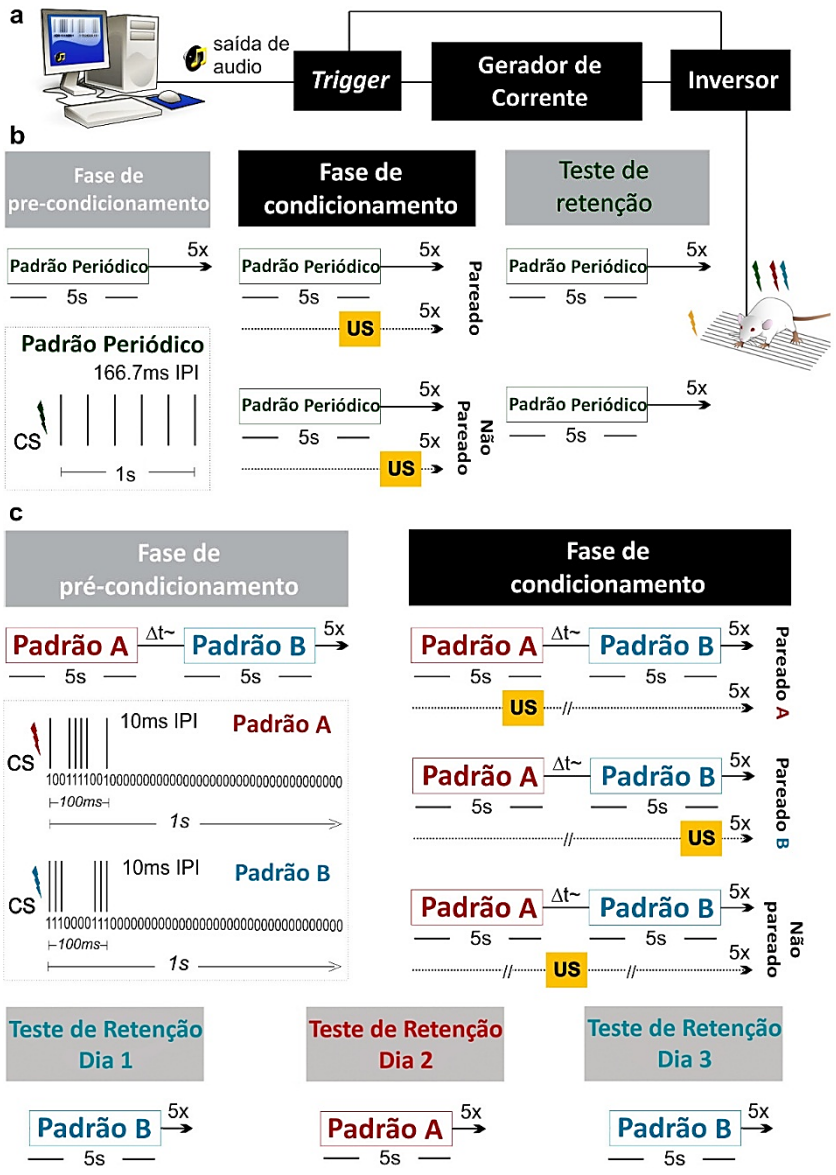


FIGURA 17: Setup experimental e Parâmetros de condicionamento. a, Setup experimental. **b,** PARADIGMA DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO. A janela de cinco segundos de apresentação do **Padrão periódico (6 Hz)** foi aplicada cinco vezes, aleatoriamente ao longo de cada sessão (1 a 3min), sendo pareado ou não com o estimulo não condicionado (**US**) durante a fase de condicionamento. **c,** PARADIGMA DISCRIMINATÓRIO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO. Foi avaliado se os animais poderiam discriminar duas sequências binárias de microestimulação elétrica, **Padrão A** ou **Padrão B**. Três grupos foram submetidos à fase de condicionamento, com diferentes pareamentos entre os padrões e **US**: **Pareado A** e Não **Pareado B**, Não **Pareado A** e **Pareado B** e **Não Pareado A** e **Não Pareado B**. A resposta condicionada foi avaliada por três dias consecutivos de forma que um código binário foi apresentado por dia: Dia 1 - **B**; Dia 2 - **A**; Dia 3 - **B**.

4.5.2 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO CONDICIONADO

O movimento dos animais foi analisado por um examinador cego, através de vídeos gravados por uma câmera (*Microsoft LifeCam* VX-700) posicionada em frente às caixas. Como já descrito na literatura, um comportamento de congelamento (*freezing*) pode ser definido como a ausência de movimentos, exceto a respiração, durante um período mínimo de três segundos, dentro de uma janela de cinco segundos (Blanchard e Blanchard, 1972; Fanselow e Bolles, 1979; Bouton e Bolles, 1980). Assim, o primeiro minuto após cada sequência de apresentação dos padrões de microestimulação foi dividido em 12 janelas de 5 segundos, de maneira a avaliar se o episódio de *freezing* ocorreu ou não dentro de cada uma (Blanchard e Blanchard, 1972; Fanselow e Bolles, 1979; Bouton e Bolles, 1980; Curzon *et al.*, 2009). O número total de eventos foi normalizado pelo total de janelas de 5 s e apresentados como percentagem.

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA – POSICIONAMENTO DOS ELETRODOS

Após os paradigmas de condicionamento, todos os animais foram anestesiados com solução de Uretana (14% p/v; 10 ml/kg), a posição dos eletrodos confirmada por uma lesão eletrolítica (0,5 mA por 2 s) e submetidos a um protocolo de perfusão cardíaca. O protocolo de perfusão constou de infusão aórtica de solução tampão fosfato salina [PBS 0,1 M (0,387 M $NaH_2PO_4.H_2O$, 0,612 M $Na_2HPO_4.7H_2O$, 1,4 M NaCl); pH=7,4; 4º C; pK=~ 7,21], seguido por solução de paraformoldeído solubilizado em PBS (PFA/PBS; 4% p/v; pH=7,4). Após perfusão, os cérebros foram removidos, pós fixados em PFA/PBS 4% p/v e mantidos a 4 ºC por 24 hs. Após esse período, foram transferidos para solução de sacarose solubilizada em PBS (30% p/v) e mantidos a 4º C por 72 hs. Finalmente, os cérebros foram congelados em Isopentano (99%) e estocados a -80ºC.

A partir de cortes coronais realizados a 40 μm (Micrótomo de Congelação, LUPE Indústria e Comércio / MC-00), algumas fatias, de acordo com as coordenadas estereotáxicas referentes ao implante do eletrodo de microestimulação, foram selecionadas e coradas para confirmação do implante, seguindo protocolo de marcação com solução de vermelho neutro [Vermelho neutro (1% p/v); acetato de sódio anidro (0,3% p/v); ácido acético glacial (0,12% v/v)] (FIGURAS 18 e 19). As fatias restantes foram estocadas a -20ºC, em solução anti-*freeze* [PBS (0,1 M pH 7,2); sacarose (30% p/v); etilenoglicol (30% v/v); polivinilpirrolidona (PVP 1% p/v)], para posterior análise de imunofluorescência.

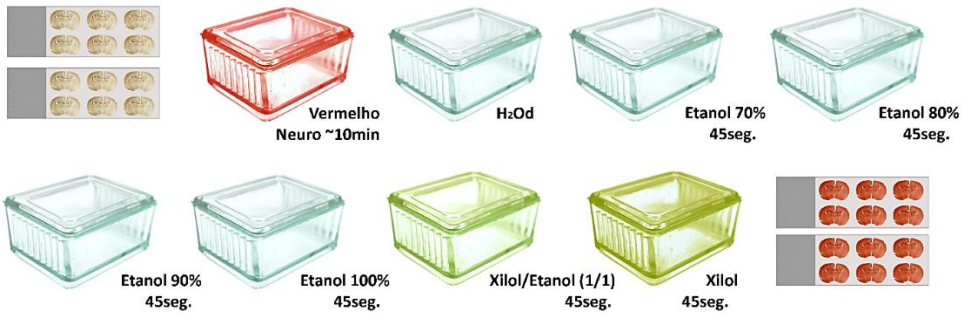


FIGURA 18: Protocolo de marcação com vermelho neutro

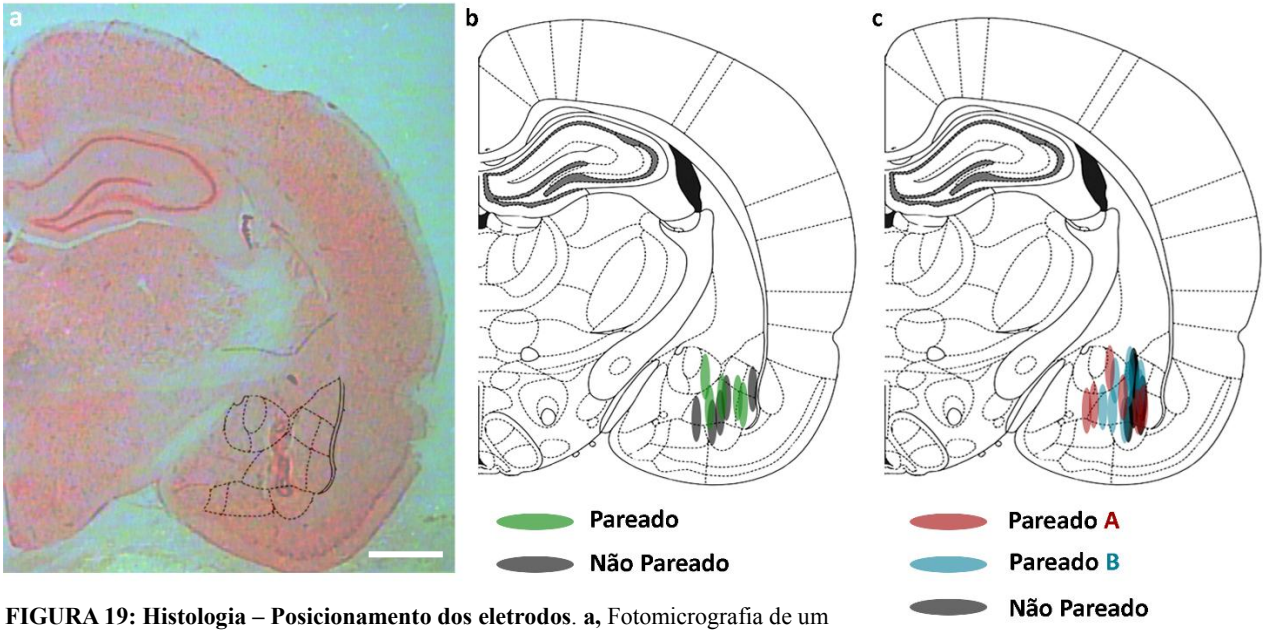


FIGURA 19: Histologia – Posicionamento dos eletrodos. **a,** Fotomicrografia de um corte histológico marcado com vermelho neutro, demonstrando o posicionamento correto do eletrodo após lesão eletrolítica (x0,8 ampliação). Barra de escala: 1 mm. **b, c,** Diagramas anatômicos demonstrando o posicionamento dos eletrodos de estimulação em todos os grupos experimentais (adaptado de: Paxinos & Watson, 2007).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição normal aproximada foi confirmada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. As comparações foram realizadas através da análise de variância *one*-way ou *two-way* ANOVA com medidas repetidas. As médias individuais foram comparadas pelo teste post-hoc *Bonferroni*, de acordo com o coeficiente de variação, e apresentadas como média ± E.P.M. A associação da contingência à primeira resposta condicionada foi analisada pelo teste de *chi-quadrado*, ao passo que a curva de probabilidade de ocorrência da primeira resposta condicionada foi analisada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov.* Os resultados foram analisados no *Software GraphPad Prism* 6.0 e *MATLAB* (The Mathworks, Natick, USA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4.8 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS, REAGENTES E SOLUÇÕES

TABELA 1: LISTA DE EQUIPAMENTOS COM DESCRIÇÃO DE MODELO E MARCA

DESCRIÇÃO	MODELO / MARCA
Estereotáxico	*Stoelting* Co., Wood Dale, IL, USA
Estimulador elétrico	DS3 / Digitimer Limited
Caixa de condicionamento ao medo	Insight® - Equipamentos, Pesquisa, Ensino. www.insightltda.com.br/
Osciloscópio digital	GW INSTEL / GDS 2202
Fonte. Tensão controlada	INSTRUTHERM DC POWER SUPPLY / FA 3030
Fonte (*Switching Power Supply*)	Fan Hung (LC-a300atx)
Estação de solda	TOYO / TS 920
Balança eletrônica de precisão decimal	Marte ®
Balança eletrônica de precisão milesimal	BG440 / Gehara^{LTDA}
Agitador magnético	TE-0851 / Tecnal
pHmetro digital	PG1800 / Gehara^{LTDA}
Micrótomo de Congelação	MC-00/ LUPE Indústria e Comércio
Bomba de perfusão	INCIBRAS / BP-100
Capela de Fluxo Laminar	PACHANE / PA050
Câmera Digital	Microsoft LifeCam VX-700

TABELA 2: LISTA DE MATERIAIS E REAGENTES COM DESCRIÇÃO DE FABRICANTE E Nº DE CATÁLOGO

DESCRIÇÃO	FABRICANTE / Nº.Cat.
Placas de circuito impresso	Stick - Circuito Impressos Profissionais www.stick.ind.br/
Componentes Eletrônicos	# (www.eletronicaguarani.com.br www.altacomponentes.com.br/)
Fios de aço (0.005'' Bare – 0.008'' Coated)	A-M Systems, INC. / 7914
Bateria de moto (9V)	ROUTE
Baterias (9V)	SONY
Álcool Isopropílico, Ácido Fosfórico (P.A. ORTO H_3PO_4)	VETEC
$NaH_2PO_4.H_2O$, $Na_2HPO_4.$ $7H_2O$, NaCl	Merck & Co., Inc
Acetato de sódio anidro (CH_3COONa)	SIGMA-ALDRICH / 41245
Sacarose, Ácido acético glacial, Etanol (100%), Xilol	SYNTH
Paraformaldeído 95%	VETEC / 694
Polivinilpirrolidona	SIGMA-ALDRICH / PCP40
Etilenoglicol	FMAIA / 113370
Isopentano (2-Methylbutane, ReagentPlus®, 99%)	SIGMA-ALDRICH / 277258
Uretana (≥ 99%)	SIGMA-ALDRICH / U2500
Vermelho neutro	Merck Darmstadt
Meio de montagem para lâminas (Entellan® New)	Merck Millipore / 107901
Gelatina	Acumedia / 7202A
Lâminas (26 x 76 mm) / Lamínulas	Bioslide
Caixa de acrílico (60 cm x 60 cm x 60 cm)	Acrildam®

TABELA 3: LISTA DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS

NOME	COMPONENTES (M e/ou %)
Paraformaldeído 4%	H_2Od NaOH (100) pH=7,4 ajustado com HCl 1 M
Tampão Fosfato Salina (PBS - 0,1 M)	H_2Od Na_2HPO_4 (0,612) NaH_2PO_4 (0,387) NaCl (1.4) pH=7,4 ajustado com HCl 1 M
Solução anti-*freeze*	PBS (0,1 M pH 7.2) Sacarose (30% p/v) Etilenoglicol (30% v/v) Polivinilpirrolidona (PVP 1% p/v)
Solução de Coloração	Vermelho neutro (1% p/v) Acetato de sódio anidro (0.3% p/v) Ácido acético glacial (0.12% v/v)

5. RESULTADOS

5.1 PARADIGMA DE CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AO MEDO

De acordo com os resultados, a aplicação do **Padrão Periódico** de microestimulação, como estímulo condicionado, satisfez as nossas premissas. Apenas durante o teste de retenção, após a associação entre os estímulos (CS-**US**), a microestimulação foi capaz de desencadear uma resposta de medo condicionada (*freezing*). O comportamento de *freezing* foi significativamente mais alto para o grupo **Pareado** (69,33 ± 5,01%) quando comparado à fase de pré-condicionamento (20,67 ± 5,26%; $p<0,01$) e ao teste de retenção do grupo **Não Pareado** (25,67 ± 8,68%; $p<0,01$) (FIGURA 20A e FIGURA 21).

5.2 PARADIGMA DISCRIMINATÓRIO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO

De acordo com os resultados durante a fase de pré-condicionamento, tanto o **Padrão A** quanto o **Padrão B** não desencadearam uma resposta aversiva significativa. Contudo, no primeiro dia do teste de retenção, quando o **Padrão B** foi reapresentado, apenas o grupo **Pareado B** apresentou uma alta e significativa resposta condicionada (49,58 ± 7,13%); (grupo **Pareado A:** 22,78 ± 5,42%, $p<0,05$; e grupo **Não Pareado:** 13,61 ± 4,41%, $p<0,001$. Durante o segundo dia, quando os grupos foram reapresentados ao **Padrão A**, o grupo **Pareado B** diminuiu sua resposta, enquanto o grupo **Pareado A** (49,72 ± 12,07%) apresentou um aumento significativo; grupo **Pareado B** :10,63 ± 2,63%, $p<0,001$; grupo **Não Pareado:** 8,61 ± 2,9%, $p<0,001$. No terceiro dia do teste, os grupos voltaram a responder de forma diferenciada, mas o grupo **Pareado B** (42,72 ± 8,98%) apresentou diferenças significativas apenas comparado ao grupo **Não Pareado** (14,17 ± 3,24%; $p<0,05$); **Pareado A:** 27,22 ± 10,61% (FIGURA 20B e FIGURA 22).

Vale ressaltar que, durante os testes de retenção (**Dia 1** e **Dia 2**), os grupos pareados apresentaram os primeiros eventos de *freezing* significativamente associados à reapresentação dos seus respectivos padrões pareados (grupo **Pareado B - Dia 1**: 16,35, d.f.=2, $p<0,001$; grupo **Pareado A - Dia 2**: 19,67, d.f.=2, $p<0,0001$; grupo **Pareado B - Dia 3**: 1,55, d.f.=2, $p=0,46$), além de uma maior probabilidade de ocorrência ao longo dos três dias (**Dia 1**, $p<0,001$; **Dia 2**, $p<0,0001$; **Dia 3**, $p<0,001$) (FIGURA 23).

O grupo **Não Pareado** manteve os valores de base ao longo dos três dias. Além disso, tanto o grupo **Pareado A** quanto o **Pareado B** apresentaram valores semelhantes ao grupo **Não Pareado** quando o padrão temporal não condicionado (CS-) foi reapresentado ao longo dos dias (FIGURA

20B, FIGURA 22 e FIGURA 23). Em uma análise intragrupo, o comportamento condicionado de ambos os grupos pareados foi estatisticamente superior ao período de pré-condicionamento e entre os respectivos dias de testes de retenção (FIGURA 20C e D)

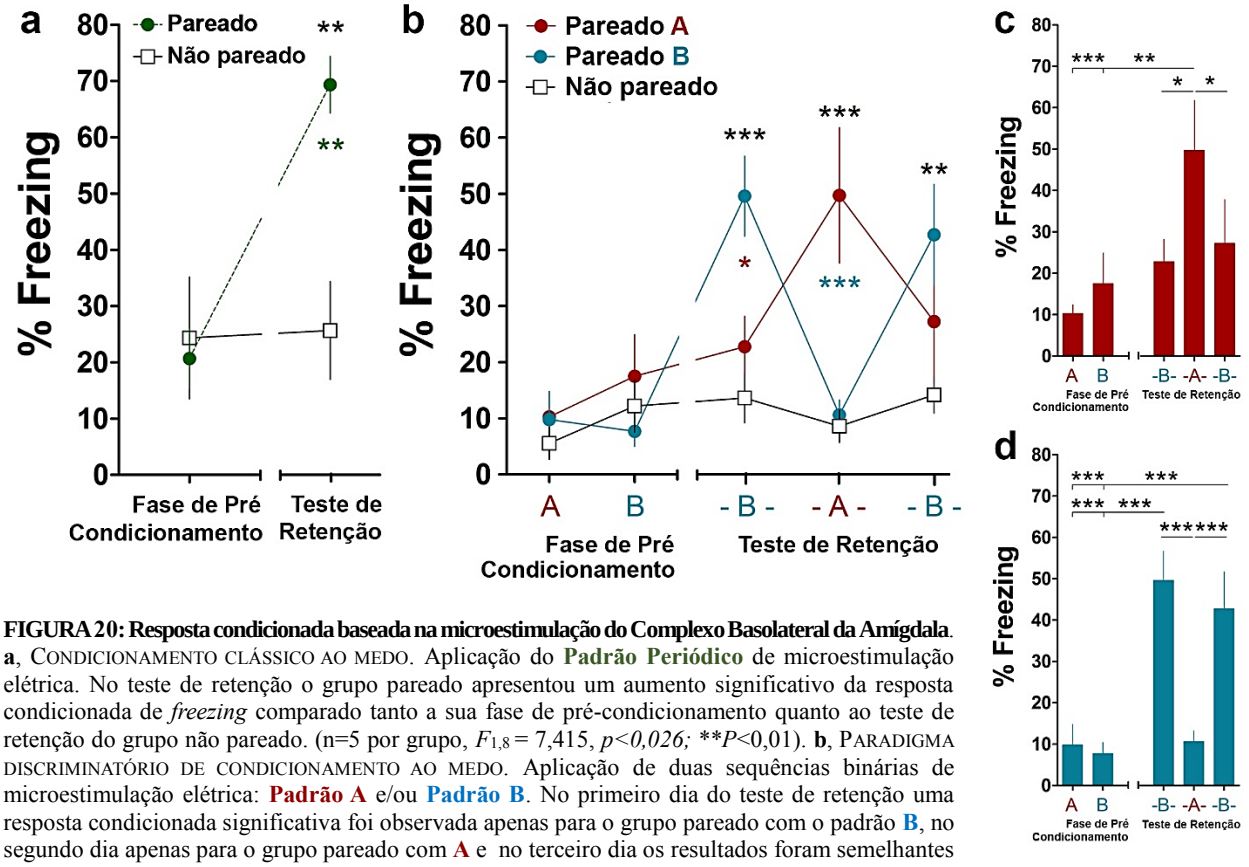


FIGURA 20: Resposta condicionada baseada na microestimulação do Complexo Basolateral da Amígdala. **a**, CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AO MEDO. Aplicação do **Padrão Periódico** de microestimulação elétrica. No teste de retenção o grupo pareado apresentou um aumento significativo da resposta condicionada de *freezing* comparado tanto a sua fase de pré-condicionamento quanto ao teste de retenção do grupo não pareado. (n=5 por grupo, $F_{1,8} = 7{,}415$, $p<0{,}026$; $^{**}P<0{,}01$). **b**, PARADIGMA DISCRIMINATÓRIO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO. Aplicação de duas sequências binárias de microestimulação elétrica: **Padrão A** e/ou **Padrão B**. No primeiro dia do teste de retenção uma resposta condicionada significativa foi observada apenas para o grupo pareado com o padrão **B**, no segundo dia apenas para o grupo pareado com **A** e no terceiro dia os resultados foram semelhantes ao primeiro dia. **c,d,** Ao longo dos testes de retenção os grupos pareados apresentaram respostas diferenciadas, com a apresentação das diferentes sequências binárias de microestimulação elétrica (**Pareado A** n=6; **Pareado B** n=8; **Não pareado** n=6, $F_{8,68} = 5{,}572$, $p<0{,}0001$; $^{*}p<0{,}05$, $^{**}p<0{,}01$, $^{***}p<0{,}001$). Percentagem de *freezing* quantificada durante o protocolo como média ± EPM.

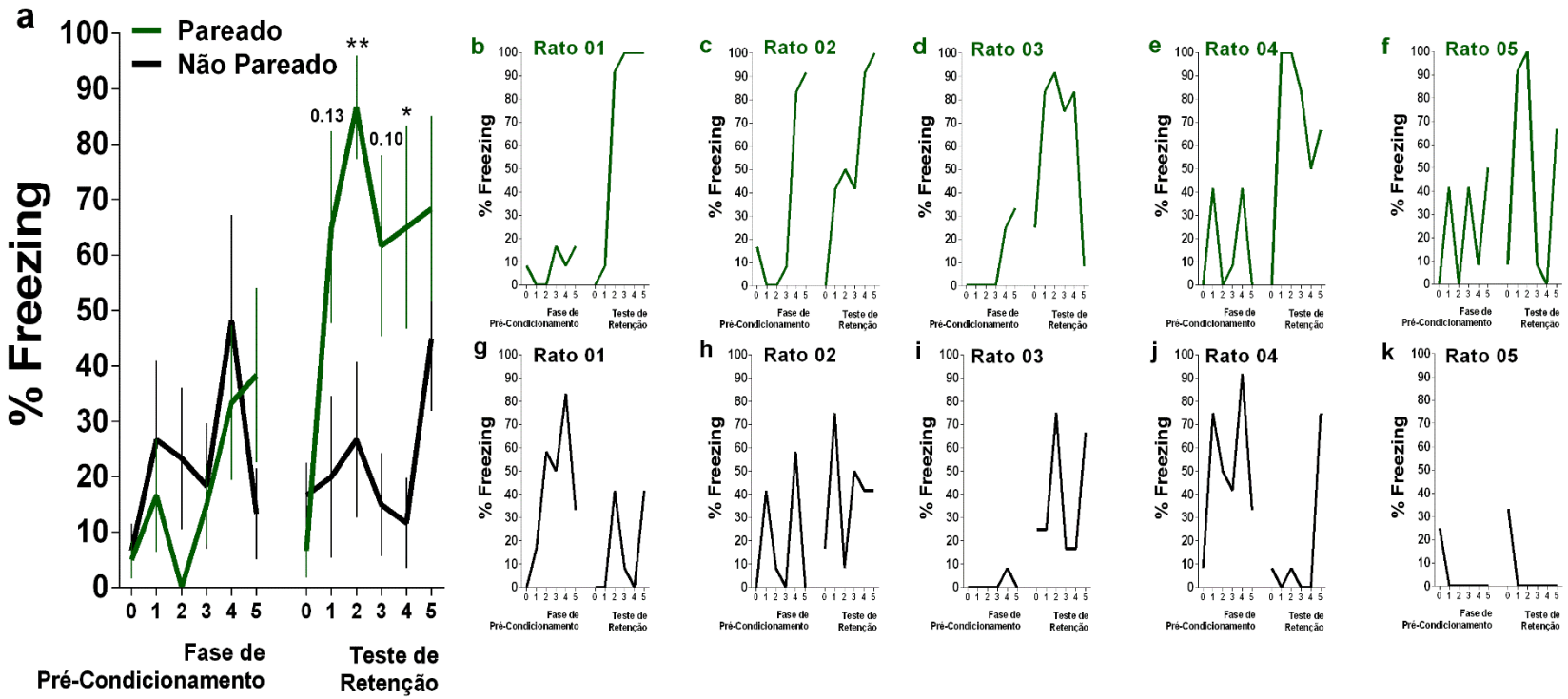


FIGURA 21: Resposta condicionada a cada apresentação do padrão de microestimulação. **a,** Média ± EPM das respostas condicionadas de *freezing* após cada apresentação do **Padrão Periódico** de microestimulação elétrica ($F_{11,88} = 2{,}978$, *p=0,0021*; *p<0,05,**p<0,01). Respostas individuais de *freezing* para os dois grupos após cada apresentação do padrão de microestimulação: **b-f**, **Pareado**. **g-k, Não Pareado**.

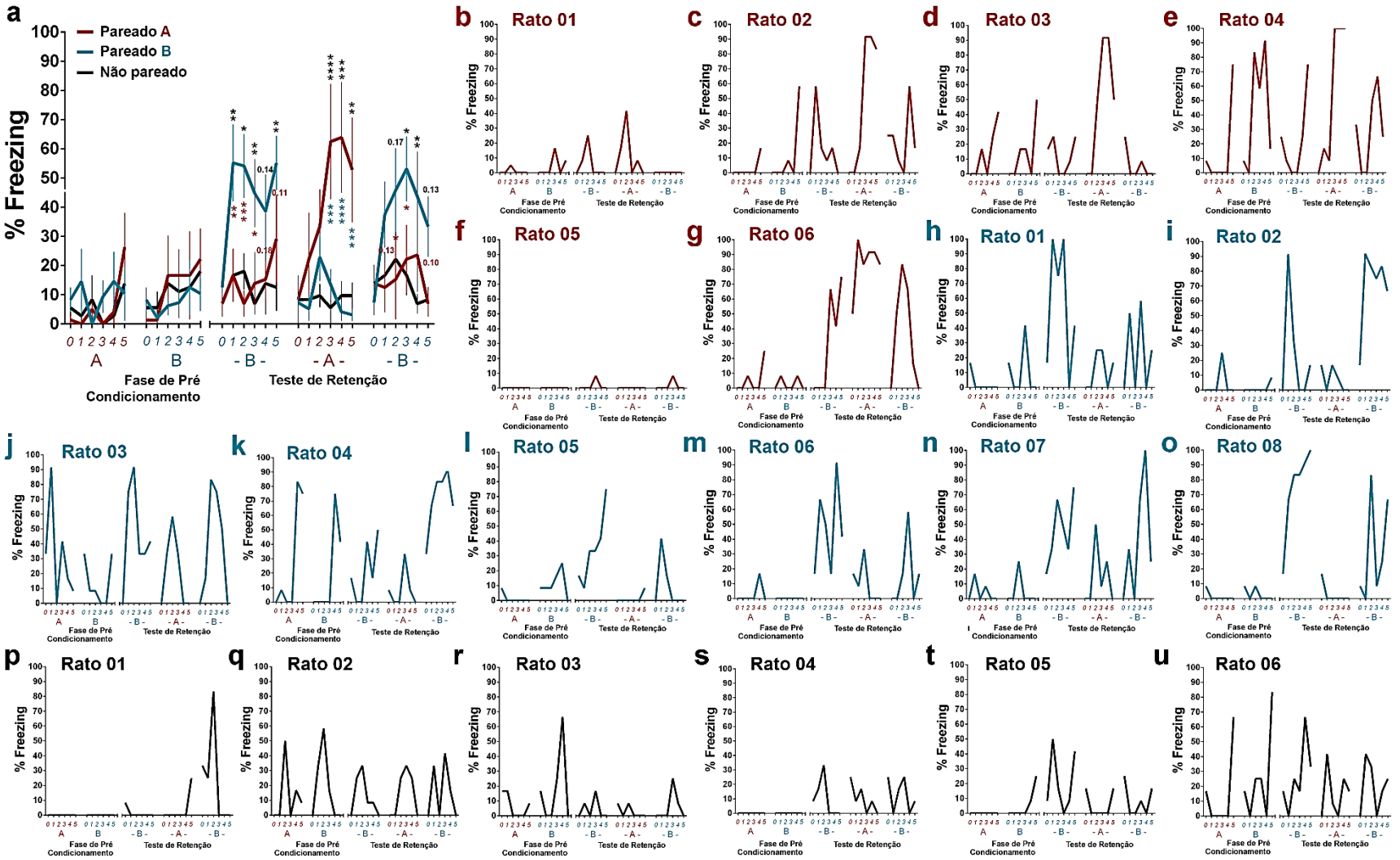


FIGURA 22: Respostas condicionadas a cada apresentação dos respectivos padrões de microestimulação. **a,** Média das respostas condicionadas de *freezing* após cada apresentação dos padrões de microestimulação ($F_{58,493} = 2{,}975$, $p<0{,}001$; *$p<0{,}05$,**$p<0{,}01$, ***$p<0{,}001$, ****$p<0{,}0001$). Respostas individuais de *freezing* para os três grupos: **b-g, Pareado A**. **h-o, Pareado B**. **p-u, Não pareado**

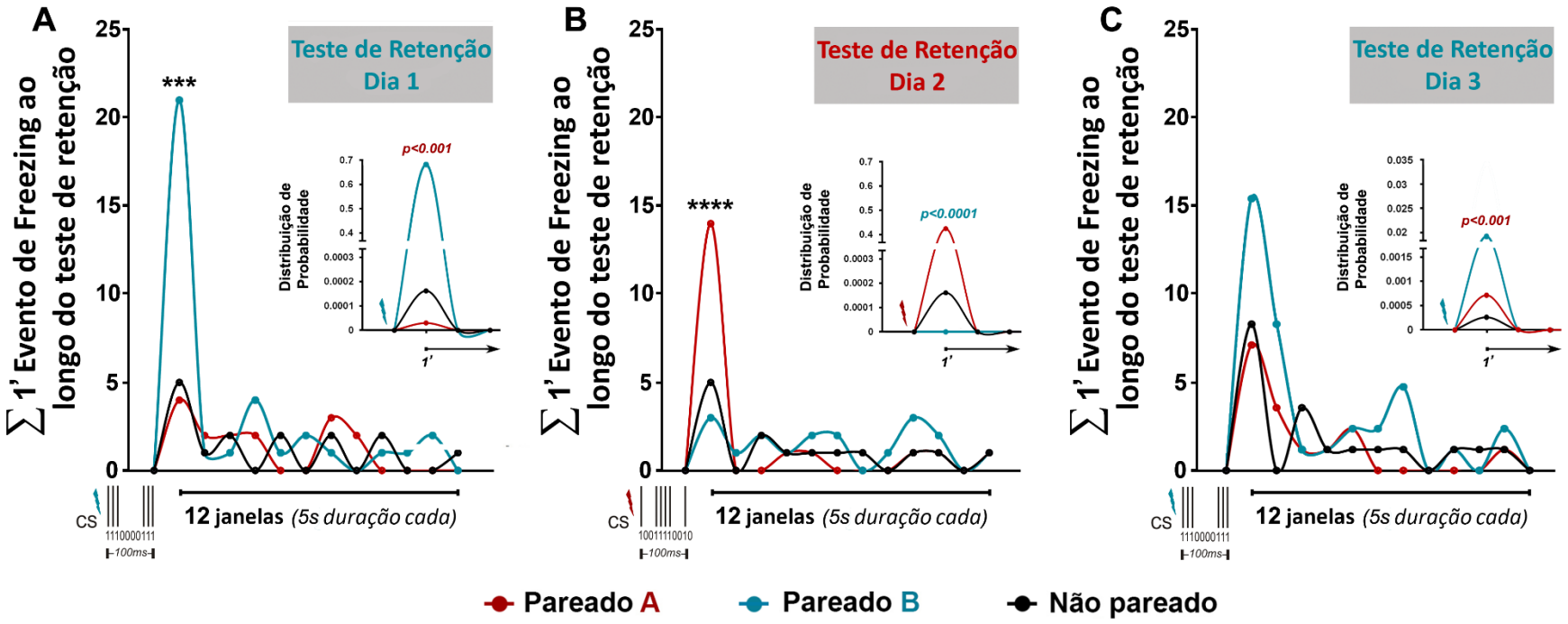
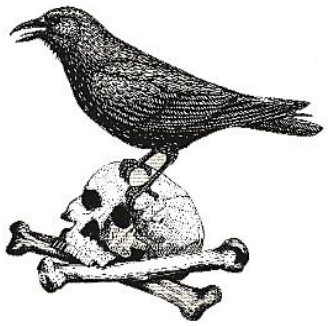


FIGURA 23: (A), (B), (C). Histograma e probabilidade de ocorrência do primeiro evento de *freezing* durante os Testes de Retenção. Somatório das primeiras ocorrências do comportamento condicionado (*freezing)* ao longo do minuto subsequente às cinco apresentações dos padrões temporais de microestimulação. Cada minuto subdividido em 12 janelas de 5 s. Histogramas comparados pelo teste c*hi-quadrado* (**A** = 16,35, d.f.=2, ****p<0,001*; **B** = 19,67, d.f.=2, *****p<0,0001*; **C** = 1,55, d.f.=2, *p=0,46*). Função de distribuição de probabilidade comparada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* (K-S *two-sample;* Probabilidade de ocorrência do primeiro evento de *freezing*; **A** = *p<0,001*; **B** = *p<0,0001*; = *p<0,001*]. **Pareado A,** n=6; **Pareado B,** n=8; **Não pareado,** n=6.

(...)

"Thus conscience does make cowards of us all
And thus the native hue of resolution
Is sicklied o'er with the pale cast of thought,
And enterprises of great pith and moment
With this regard their currents turn awry,
And lose the name of action."



6. O DUELO EM UMA TOMADA DE DECISÃO

Os seres vivos dedicam boa parte do seu tempo a processos de tomada de decisão. Uma contínua batalha que procura constantemente o melhor caminho para a sobrevivência. Esses processos dependem de uma análise da relevância de estímulos ambientais e suas potenciais consequências para o indivíduo em termos de riscos e benefícios.

As redes neurais formadas por pequenos agrupamentos de neurônios, como ocorre por exemplo em invertebrados, ou por grandes substratos evolutivamente complexos, presentes em mamíferos, absorvem um grande espectro de estímulos ambientais. Estes estímulos, por ventura desconhecidos ou irrelevantes, quando associados a uma valência emocional, podem ser aprendidos e discriminados, contribuindo para a formação de um grande repertório comportamental (Simon, 1988; Ledoux, 1995).

A partir dos estímulos ambientais e, em paralelo, ao planejamento e execução das respostas comportamentais, os seres vivos filogeneticamente mais complexos são capazes de elaborar modelos preditivos a respeito de circunstâncias futuras (FIGURA 24). Dentro de uma ampla gama de possibilidades projetadas, esses modelos incluem as próprias consequências do comportamento planejado (Simon, 1988; Freeman, 1991).

Na regulação da emoção, o Córtex Pré-Frontal (PFC) é reconhecido como um dos principais substratos modulatórios que, de forma consciente ou subconsciente, modula a resposta comportamental em processos complexos de tomadas de decisão (Bechara *et al.*, 2000). Esta modulação protege frágeis representações neurais de interferências advindas tanto de distrações externas quanto internas.

As características funcionais mais estudadas do PFC dizem respeito ao reconhecimento e a discriminação de contingências pré estabelecidas (Bechara *et al.*, 2000; Hata e Okaichi, 2004; Zelinski *et al.*, 2010), junto a inibição de respostas comportamentais que não são mais consideradas relevantes (Morgan e Ledoux, 1995; Morgan *et al.*, 2003; Quirk *et al.*, 2003; Milad *et al.*, 2004; Likhtik *et al.*, 2005; Moscarello e Ledoux, 2013). Este reconhecimento é fundamental em processos preditivos inibindo ações inadequadas e auxiliando operações definidas como relevantes (Likhtik *et al.*, 2014).

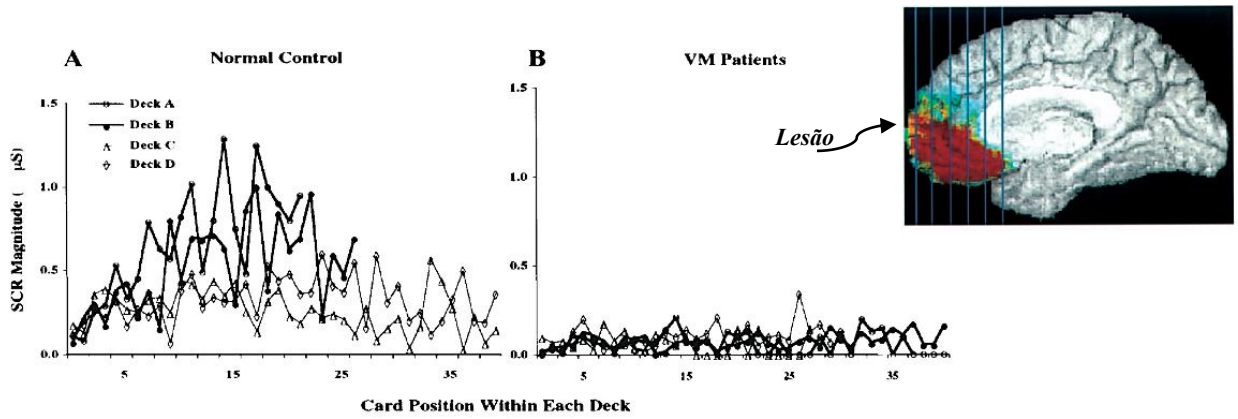


FIGURA 24: Córtex Pré-Frontal. Antecipação e predição em uma tomada de decisão. A, B, Resposta antecipatória medida pela condutância da pele (SCR) frente a possibilidade de um reforço ou uma punição. Pacientes normais foram comparados a pacientes com lesões no Córtex Pré-Frontal ventromedial (VM). Durante a tarefa (*the gambling task*) foram apresentadas quatro possíveis escolhas, duas tidas como erradas (*Deck*: A e B) e duas corretas (*Deck*: C e D). O Grupo controle (normais), à medida que se tornava mais experiente, gradualmente apresentou respostas antecipatórias com altas amplitudes, principalmente quando se deparava a uma escolha errada. Os pacientes VM não apresentaram respostas em nenhuma das situações. Sugere-se que VM apresente uma incapacidade se gerar respostas fisiológicas autônomas e preparatórias em determinada contingência, além de uma inabilidade de realizar escolhas (Adaptado de: Bechara *et al*., 2000).

Em termos anatômicos o PFC corresponde à metade rostral do Córtex Frontal, sendo formado pelas áreas lateral, medial e orbital, anteriores ao Córtex Pré-Motor (Barbas, 1995).

Em roedores, diversas funções tem sido atribuídas ao Córtex Pré-Frontal medial (mPFC), dentre elas os processos de tomadas de decisão. Esta região consiste de quatro subdivisões principais, definidas como: Agranular (Pré-Central) Medial (AGm), Cingulado Anterior (AC) (subdividido em dorsal e ventral), Córtex Pré-Limbico (PrL) e Córtex Infra-Límbico (IL). Enquanto as subdivisões mais dorsais, AGm e AC, estão relacionadas a comportamentos motores, as regiões ventrais, PrL e IL, são associadas a respostas emocionais, cognitivas e processos mnemônicos (Uylings *et al.*, 2003; Vertes, 2004).

Os Córtices PrL e IL são comumente tratados como uma única região apesar de aparentemente apresentarem funções distintas. O IL pode controlar primariamente funções vísceromotoras, ao passo que o PrL participa de processos cognitivos. Contudo, ambos os substratos enviam projeções, mesmo que em diferentes densidades, para os neurônios da substancia cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo do trato solitário, complexo amigdaloide e hipotálamo, além de apresentarem alvos em neurônios do tronco cerebral (Mcdonald *et al.*, 1996; Vertes, 2004). Estas projeções descentes participam ativamente de tarefas de aprendizado associativas.

No condicionamento ao medo, evidências demonstraram que quando CS é apresentado repetidamente na ausência de US, as projeções do mPFC modulam negativamente seus alvos

participando do processo de extinção da memória aversiva (Quirk *et al.*, 2006). A inibição desses alvos pode ser considerada uma forma eficiente de atenuação das múltiplas respostas condicionadas que ocorreriam em consequência de mudanças na contingência pré-estabelecida durante o condicionamento (FIGURA 25).

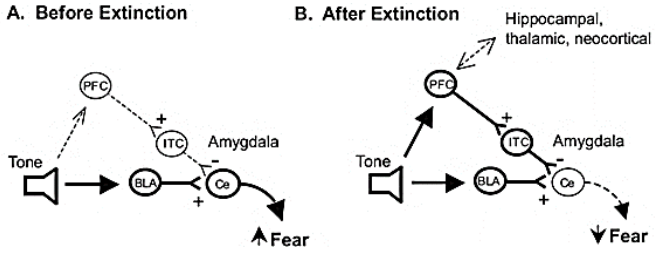


FIGURA 25: Modulação PFC sobre a resposta condicionada ao medo. A, Antes da extinção CS ativa a núcleo Basolateral da Amígdala (BLA) que por sua vez ativa os neurônios da saída do Núcleo Central (Ce), responsáveis pela resposta de medo. **B,** Após a extinção a resposta do PFC a CS é potenciada, ativando Células Intercalares (ITC) gabaérgicas que inibem o Ce. A inibição de ITC sobre Ce compete com a excitação de BLA inibindo a resposta condicionada de medo. A potenciação e a modulação de PFC também pode envolver recíprocas interações com vias hipocampais, talâmicas e neocorticais. (adaptado de: Quirk *et. al*., 2006 e Milad *et. al*., 2004).

Assim, baseado em nossos resultados comportamentais, hipotetizamos que uma região polimodal e associativa como o Complexo Amigdaloide, quando utilizada como alvo para a microestimulação atuará muito mais do que apenas uma região de convergência de circuitos. Nesse caso, após o condicionamento ao medo, um padrão temporal de microestimulação, não associado a uma valência biológica relevante (**US**), recrutará substratos envolvidos na modulação negativa da resposta condicionada. Por outro lado, se um padrão temporal associado a **US** for aplicado, os substratos responsáveis pela resposta condicionada serão favorecidos (FIGURA 26).

OBJETIVO ESPECÍFICO 3

Quantificar a expressão da proteína ***c-Fos*** (marcador de atividade neuronal) e comparar os perfis de ativação do Córtex Pré-Frontal, Complexo Amigdaloide e Hipotálamo, após o paradigma discriminatório de condicionamento ao medo.

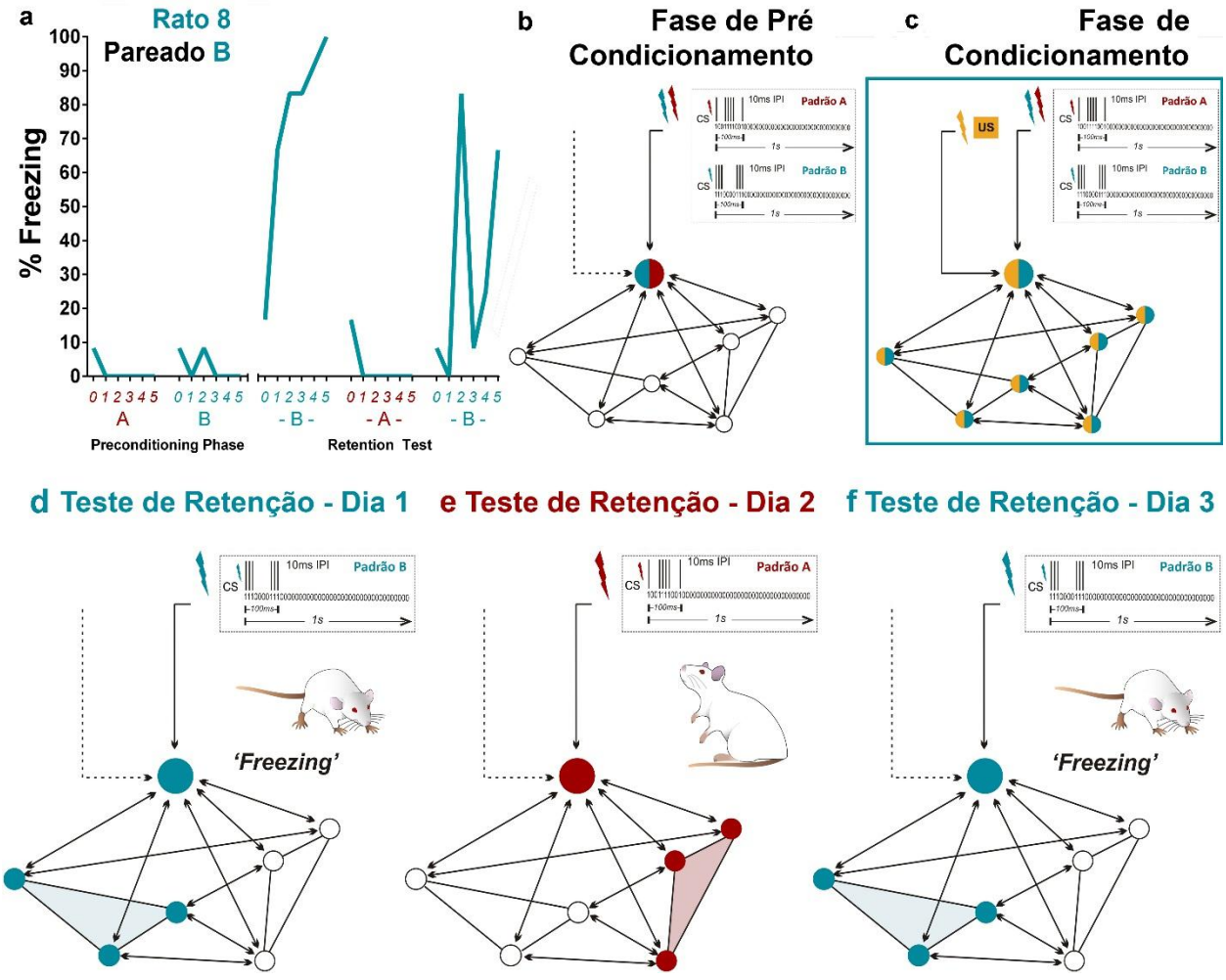


FIGURA 26: **Hipótese. Discriminação do medo condicionado** [1]. **a**, Resposta individual condicionada de *freezing* para o rato 8 após cada apresentação do **Padrão B** e do **Padrão A** ao longo dos dias. O **Padrão B,** aplicado no complexo basolateral direito, foi discriminado do **Padrão A**, como evidenciado pela alta resposta comportamental condicionada durante o dia 1 e 3 do teste de retenção. **b**, A aplicação de ambos os padrões, **A** e **B**, na fase de pré-condicionamento não gerou, por si só, nenhuma resposta comportamental aversiva. **c,** Durante a fase de condicionamento o padrão temporal **B**, associado ao estímulo não condicionado (**US**), potenciou a conectividade da rede ressonante Amígdala-Hipotálamo facilitando a saída do sinal para a resposta de medo. **d,f,** A aplicação dos padrões temporais promoveu a emergência de diferentes estados cerebrais durante o paradigma discriminatório. Estes estados de funcionamento do cérebro são capazes de recrutar específicas redes ressonantes, dependendo da sequência binária pareada durante a fase de condicionamento. Azul: circuito Amígdala-Hipotálamo; Vermelho: circuito Amígdala-córtex Pré-Frontal medial.

[1] Baseado no modelo teórico de aprendizagem *Adaptive Ressonance Theory:* Identificação e reconhecimento de objetos através da interação *TOP→DOWN* (análogo a expectativas, experiências) com a informação sensorial *Bottom→UP.* Esta comparação origina uma medida da categoria de um objeto/estímulo que dentro de um limiar será considerado membro de uma classe já esperada. Solução para o problema "plasticidade/estabilidade" onde novos conhecimentos podem ser adquiridos sem perturbar o existente (Grossberg, 1980; 1999).

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 IMUNOFLUORESCÊNCIA

7.1.1 PROTOCOLO DE TRIPLA MARCAÇÃO *c-Fos,* NeuN e DAPI

Ao final do paradigma discriminatório de condicionamento ao medo, mais especificamente ao final do terceiro dia do Teste de Retenção, todos os animais foram sacrificados e perfundidos conforme descrito na sessão 4.6. No caso, objetivando o tempo de maior expressão proteica, o sacrifício foi realizado uma hora e trinta minutos após a última apresentação de CS (**Padrão B**) (Worley *et al.*, 1993; Knapska e Maren, 2009).

As fatias cerebrais, previamente estocadas em solução anti-*freeze,* foram simultaneamente processadas. Foi utilizado anticorpos imunorreativos para *c-Fos* (Miller *et al.*, 1984), além de marcações controles com NeuN (Mullen *et al.*, 1992) e DAPI (Russell *et al.*, 1975)

Inicialmente as fatias foram lavadas com solução tampão fosfato [PB 0.1 M ($NaH_2PO_4.H_2O$ 0.387 M, $Na_2HPO_4.7H_2O$ 0,612 M); pH=7,4; pK=~ 7,21] por 5 min, 5x. Para diminuir a inespecificidade das ligações anticorpo/alvo, as fatias seguiram para uma incubação em solução de glicina (0,1 M), solubilizada em PB, por 20 min e novamente lavadas em PB por 5 min, 3x.

Após a lavagem inicial, as fatias foram incubadas em solução de bloqueio [BS - PB 0,1 M + Triton X-100 (PB-T 0,5% v/v); Soro de Cabra (NGS 5% p/v) e Soro fetal Bovino (BSA 1% p/v)] por 1 h, em temperatura ambiente, seguindo por incubação em solução com os anticorpos primários, por 24 h, também em temperatura ambiente [BS + *rabbit* anti-c-Fos (1:2000), Santa Cruz Biotechnology, INC.; *mouse* anti-NeuN (1:500), MILLIPORE].

Após a incubação primária as fatias foram lavadas com PB por 5 min, 4x. Após lavagem foram incubas em solução com os anticorpos secundários, protegidas da luz, por 1 h, em temperatura ambiente [BS + Alexa Fluor® 488 *goat* anti-*rabbit* (1:500), Molecular Probes®; Alexa Fluor® 647 *goat* anti-*mouse* (1:500), Molecular Probes®]. Ao final foram lavadas com PB por 5 min, 4x e incubadas por 15 min em solução com DAPI [BS + DAPI (1:10000), Molecular Probes®].

Finalmente as fatias foram lavadas com solução PB-T por 10 min, 6x e montadas em lâminas (Superfrost® Plus) com gel aquoso de montagem não-fluorescente (Hidromount ™). Para posterior análise, as lâminas montadas foram protegidas da luz e estocadas a 4ºC.

7.1.2 ANÁLISE DA IMUNOREATIVIDADE (IR) DE *c-Fos*

Para a análise da expressão de *c-Fos,* o número de neurônios IR marcados foram contados. Imagens foram realizadas no Complexo Amigdaloide esquerdo, cobrindo os núcleos Lateral (La), Central (Ce) e Basolateral BLAe), além do Complexo Basolateral da Amígdala direita (BLAd, região de implante do eletrodo de microestimulação) (Hall *et al.*, 2001; Knapska *et al.*, 2007) e Hipotálamo, nos núcleos Dorsomedial (DMD) e Ventromedial (VMH) (Colpaert e Wiepkema, 1976; Canteras, 2002) [AP: -2,8mm (Paxinos e Watson, 2007)] (FIGURA 27). Além disso, imagens formam realizadas no Córtex Pré-Prontal medial (mPFC), cobrindo o Córtex Pré-Límbico (PrL) e o Córtex Infra-Límbico (IL) (Marek *et al.*, 2013) [AP: + 3,2mm to +2,20mm (Paxinos e Watson, 2007)] (FIGURA 28).

As imagens foram adquiridas em um microscópio de fluorescência (*Axio Imager.M2 - Zeiss system*) com objetivas de 5x, 20x/0.5, 40x/0.75 e 100x/1.3, através do software *Carl Zeiss Axiovision 4.8*. Foram fotografadas de três a cinco imagens para cada região de interesse (ROI) e ao final realizado uma média, de modo a obter um valor único para cada região. Ressalta-se que a posterior quantificação foi realizada com as imagens amplificadas em 40x.

O tempo de exposição foi configurado com o mesmo valor para todos os dados coletados. Para cada ROI, as imagens foram separadamente adquiridas ao longo do eixo z (mínimo de ~4µm por corte óptico), utilizando filtros compatíveis com as características de excitação/emissão de cada marcador fluorescente (*c-Fos* 450-490/515; NeuN 640/690; DAPI 365/445).

Os arquivos brutos foram reconstruídos e analisados utilizando o *software Image-J* (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Inicialmente o *background* auto fluorescente foi subtraído, através do mesmo limiar de filtragem para todas imagens e então o número de células IR positivas, com colocalização entre c-Fos^{+}/NeuN, foram determinadas pelo *plugin colocalization threshold – Image-J* (http://fiji.sc/Colocalization_Threshold) (Costes *et al.*, 2004).

As imagens das células colocalizadas foram convertidas para 8-bits, definidas como partículas de pelo menos 30- a 40- µm^2 e o número total automaticamente quantificado. O total de células NeuN positivas foram determinadas de acordo com a colocalização com o sinal positivo para DAPI e utilizando os mesmos parâmetros, o número total de neurônios foi quantificado. Assim o total de células c-Fos^{+}/NeuN foi normalizado pelo total de neurônios e expressos em termos de c-Fos^{+}/NeuN (%). Por fim as imagens foram digitalizadas e sobrepostas. Os valores de contraste e brilho foram similarmente ajustados para cada resultado ilustrativo (FIGURA 29).

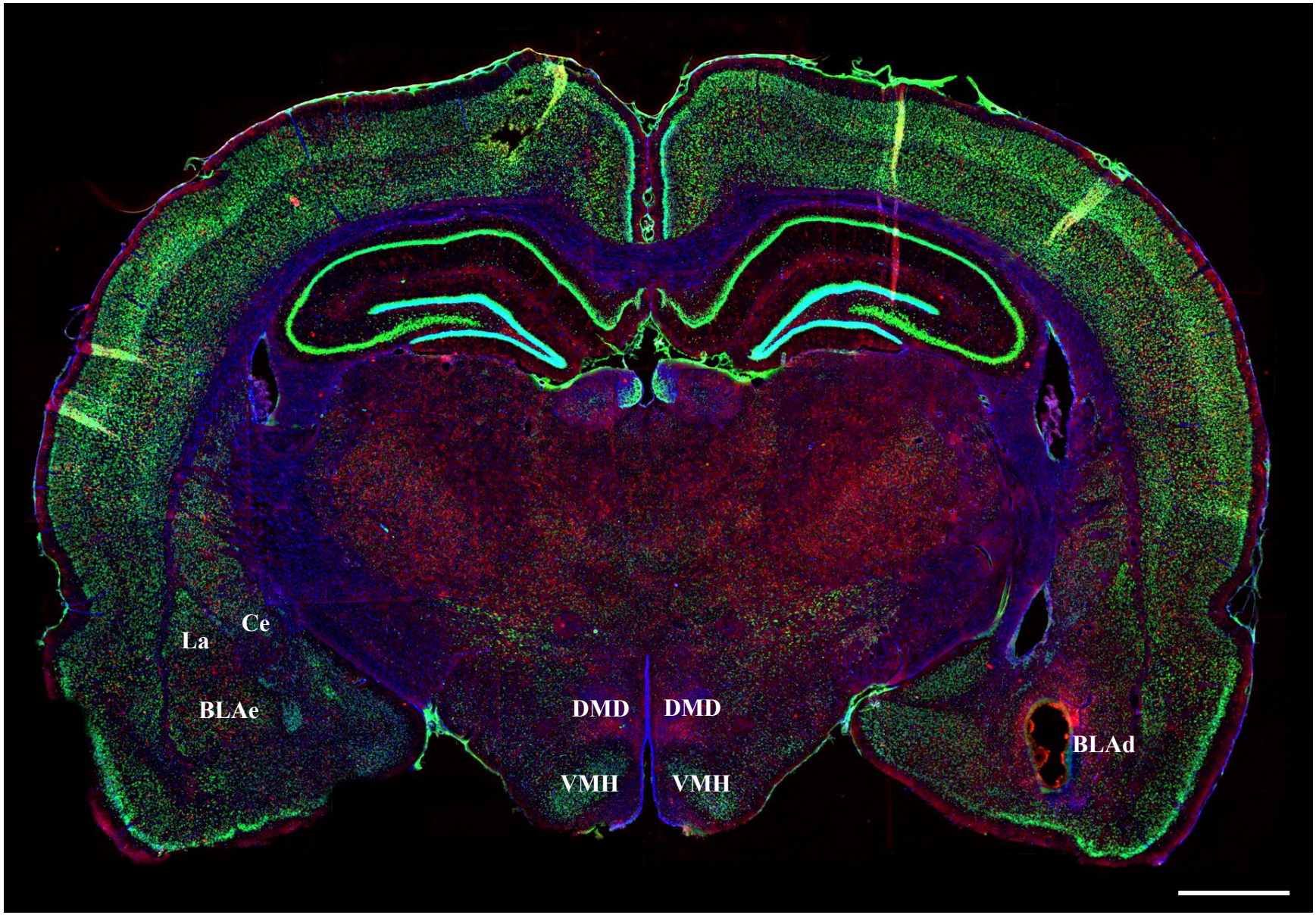


FIGURA 27: Mosaico corte antero-posterior (AP – 2,8 mm). Tripla marcação *c-Fos*, NeuN, DAPI. Regiões de interesse analisadas: Complexo Amigdaloide esquerdo, cobrindo os núcleos Lateral (La), Central (Ce) e Basolateral BLAe, além do Complexo Basolateral da Amígdala direita (BLAd, região de implante do eletrodo de microestimulação) e Hipotálamo, núcleos Dorsomedial (DMD) e Ventromedial (VMD). NeuN – verde, *c-Fos* – vermelho, DAPI – azul. Conjunto de 28 imagens. Amplificação: 5x. Barra de escala: 2 mm.

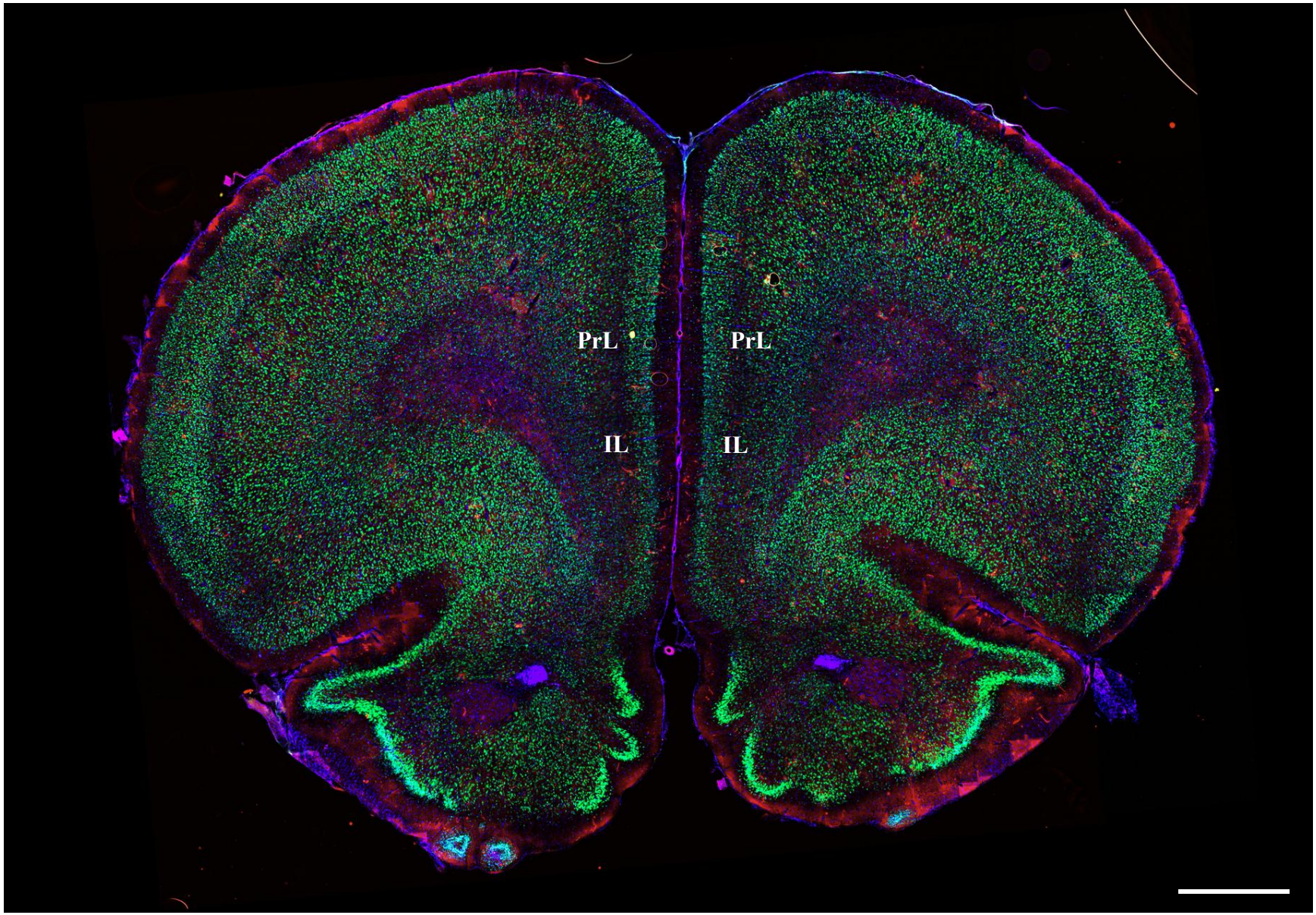


FIGURA 28: Mosaico corte antero-posterior (AP ~+3,2 mm) tripla marcação *c-Fos*, NeuN, DAPI. Regiões de interesse analisadas: Cortex Pré-Límbico (PrL) e Córtex Infra-Límbico (IL). NeuN – verde, *c-Fos* – vermelho, DAPI – azul. Conjunto de 28 imagens. Amplificação: 5x. Barra de escala: 2 mm.

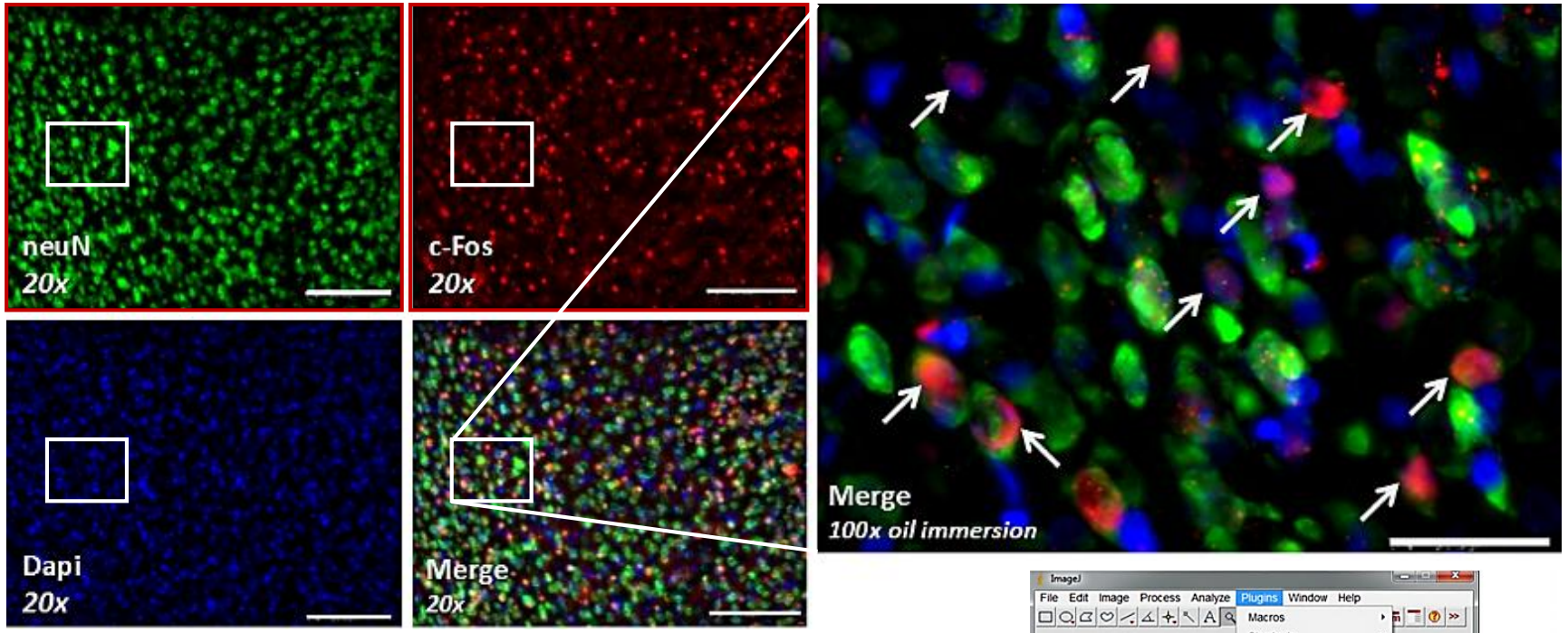


FIGURA 29: Protocolo de tripla marcação *c-Fos*, NeuN, DAPI e análise da imunoreatividade de *c-Fos*[1]. Os painéis acima representam imagens ilustrativas para o Córtex Pré-Límbico (PrL). A esquerda imagens ilustrativas para as marcações com NeuN, *c-Fos*, DAPI e a sobreposição das 3 imagens (MERGE - composição com os 3 filtros). Amplificação: 20x/0.5. Barra de escala: 200 µm. A direita amplificação: 100x/1.3 com imersão a óleo. Barra de escala: 100 µm. Painel abaixo: aplicação do *plugin colocalization threshold* – *Image-J*. Imagens colocalizadas c-Fos^{+}/NeuN (branco).

[1] Análise: Inicialmente o *background* de autofluorescência foi subtraído com limiares semelhante. O número de marcações positivas para c-Fos^{+}/NeuN foram determinadas pelo *pluggin colocalization threshold* do *Image-j*. As células com marcações colocalizadas foram convertidas para 8-bits, definidas como partículas entre 30 e 40 µm^2 e automaticamente quantificadas. O total de células NeuN positivas foram determinadas e quantificadas com os mesmos parâmetros, de acordo com o sinal positivo para DAPI. O número de marcações c-Fos^{+}/NeuN positivas foram normalizadas pelo total de neurônios e expressos como percentagem.

7.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição normal aproximada foi confirmado pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. As comparações foram realizadas através da análise de variância *one-way* ou *two-way* ANOVA com medidas repetidas. As médias individuais foram comparadas pelo teste post-hoc *Bonferroni* e ou *Dunnett,* de acordo com o coeficiente de variação e apresentadas como média ± E.P.M. A Correlação entre a imunoreatividade de *c-Fos* e o comportamento de *freezing* foi analisada pelo teste de *Pearson*. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. Os resultados foram analisados no *Software GraphPad Prism* 6.0.

7.3 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS, REAGENTES E SOLUÇÕES

TABELA 4: LISTA DE EQUIPAMENTOS COM DESCRIÇÃO DE MODELO E MARCA

DESCRIÇÃO	**FABRICANTE / Nº.Cat.**
Microscópio de Fluorescência	*Zeiss system*. *Axio Imager.M2*

TABELA 5: LISTA DE MATERIAIS E REAGENTES COM DESCRIÇÃO DE FABRICANTE E Nº DE CATÁLOGO

DESCRIÇÃO	**FABRICANTE / Nº.Cat.**
rabbit anti-c-Fos polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology, INC./sc-52
mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) monoclonal antibody	MILLIPORE / MAB377
Alexa Fluor® 488 *goat* anti-*rabbit* IgG	Molecular Probes® / A-11008
Alexa Fluor® 647 *goat* anti-*mouse* IgG	Molecular Probes® / A-21235
DAPI	Molecular Probes®/ D1306
Lâminas (26x76mm) e Lamínulas	Superfrost® Plus
Gel aquoso de montagem não-fluorescente	Hidromount ™

TABELA 6: LISTA DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS

NOME	COMPONENTES (M e/ou %)
Tampão Fosfato (PB - 0,1 M)	H_2Od Na_2HPO_4 (0,612) NaH_2PO_4 (0,387) pH=7,4 ajustado com HCl 1 M
Solução PB-T	PB (0,1) Triton X-100 (0.5% v/v)
Solução de Glicina	PB (0,1) Glicina (0.1)
Solução de bloqueio (BS)	PB-T Soro de Cabra (NGS 5% p/v) Soro fetal Bovino (BSA 1% p/v)
Solução - Anticorpo primário	BS *rabbit* anti-c-Fos (1:2000) *mouse* anti-NeuN (1:500)
Solução - Anticorpo secundário	BS Alexa Fluor® 488 *goat* anti-*rabbit* (1:500) Alexa Fluor® 647 *goat* anti-*mouse* (1:500)
Solução - DAPI	BS DAPI (1:10000)

8. RESULTADOS

De acordo com os resultados, após a reapresentação do **Padrão B** no terceiro dia do teste de retenção, os grupos apresentaram expressões de *c-Fos* bem distintas entre os substratos.

No hipotálamo, o grupo **Pareado B** apresentou marcações significativamente mais altas em ambos os núcleos avaliados [DMD (11,99 ± 1,75%) e VMH (33,83 ± 6,53%)], tanto comparado ao grupo **Pareado A** [DMD (2,75 ± 1,13%); $p<0,001$ e VMH (12,50 ± 4,92%; $p<0,05$)] quanto ao grupo **Não Pareado** [DMD (3,73 ± 0,97%); $p<0,01$ e VMH (10,38 ± 2,38%; $p<0,05$)] (FIGURA 30).

No complexo amigdaloide esquerdo os resultados em ambos os núcleos foram semelhantes aos encontrados no Hipotálamo. Contudo, assim como no resultado comportamental, com diferenças significativas apenas entre grupo **Pareado B** [La (17,41 ± 4,94%), Ce (12,51 ± 2,28%) e BLAe (31,78 ± 8,81%)] comparado ao grupo **Não Pareado** [La (1,30 ± 0,52%); $p<0,05$, Ce (0,52 ± 0,52%); $p<0,01$ e BLAe (4,85 ± 2,15%); $p<0,05$]. [**Pareado A** La (7,48 ± 3,06%), Ce (6,38 ± 2,64%) e BLAe (13,79 ± 5,84%)] (FIGURA 31 A-H).

Em ambos os casos, Hipotálamo e Amigdala, o grupo **Pareado A** e o grupo **Não Pareado** não apresentaram diferenças significativas.

Já no Complexo Amigdaloide direito os grupos não apresentaram diferenças significativas. De qualquer maneira, em uma análise pareada entre os hemisférios cerebrais (BLAe x BLAd) apenas o grupo **Pareado A** apresentou diferenças significantes [BLAd= **Pareado A** (36,27 ± 3,79%); $p<0,01$] [BLAd= **Pareado B** (34,36 ± 9,97%) e **Não Pareado** BLAd (13,60 ± 5,50%)] (FIGURA 32)

Por outro lado, a apresentação do **Padrão B** favoreceu a ativação do Córtex Pré-Frontal no grupo **Pareado A**, com significativa expressão de *c-Fos* em ambas as regiões analisadas [PrL (28,33 ± 7,78%) e IL (28,20 ± 8,82%)], tanto comparado ao grupo **Pareado B** [PrL (4,15 ± 1,81%); $p<0,01$ e IL (2,19 ± 1,25%; $p<0,01$)] quanto ao grupo **Não Pareado** [PrL (2,61 ± 1,23%); $p<0,01$ e IL (3,14 ± 1,49%; $p<0,01$)] (FIGURA 31 I-N).

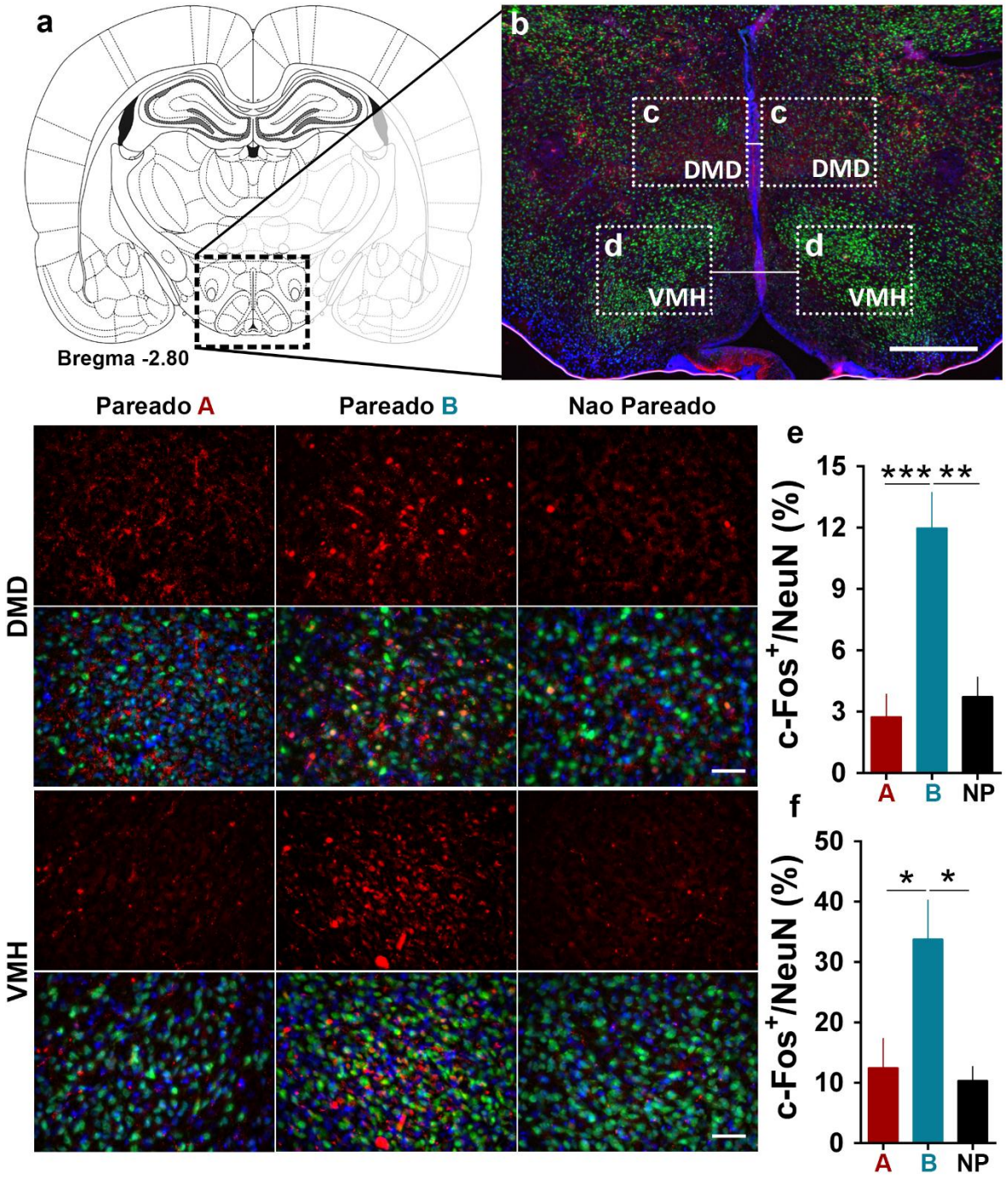


FIGURA 30: Imunofluorescência com tripla marcação no Hipotálamo, após a reapresentação do Padrão B, no terceiro dia do teste de retenção. **a,** Diagrama representativo do corte analisado. **b,** Típica imunofluorescência com tripla marcação (NeuN – verde, *c-Fos* – vermelho, DAPI – azul) representando aos regiões de interesse analisadas (ROI's); **c,** Dorsomedial (DMD), **d,** Ventromedial (VMH); ampliação: 5x; barra de escala: 1 mm. Painel inferior esquerdo: Típica imunofluorescência com tripla marcação para todos os grupos, representando VMH e DMD; ampliação 40x; barra de escala: 100 µm. **e,f,** Gráficos apresentando a média de neurônios imunorreativos para c-Fos^{+}/NeuN em cada uma das específicas ROI's . O grupo **Pareado B** apresentou um aumento significativo da imunoreatividade para *c-Fos* quando comparado ao grupo **Pareado A** e ao grupo **Não Pareado**. (**Pareado A** vermelho n=6; **Pareado B**, azul n=7; **Não Pareado**, preto n=6. DMD, $F_{2,16} = 13{,}85$, $p=0{,}003$; $^{**}P<0{,}01$, $^{***}P<0{,}001$. VMH, $F_{2,16} = 6{,}631$, $p=0{,}008$; $^{*}P<0{,}05$). Todos os resultados estão apresentados como média ± EPM.

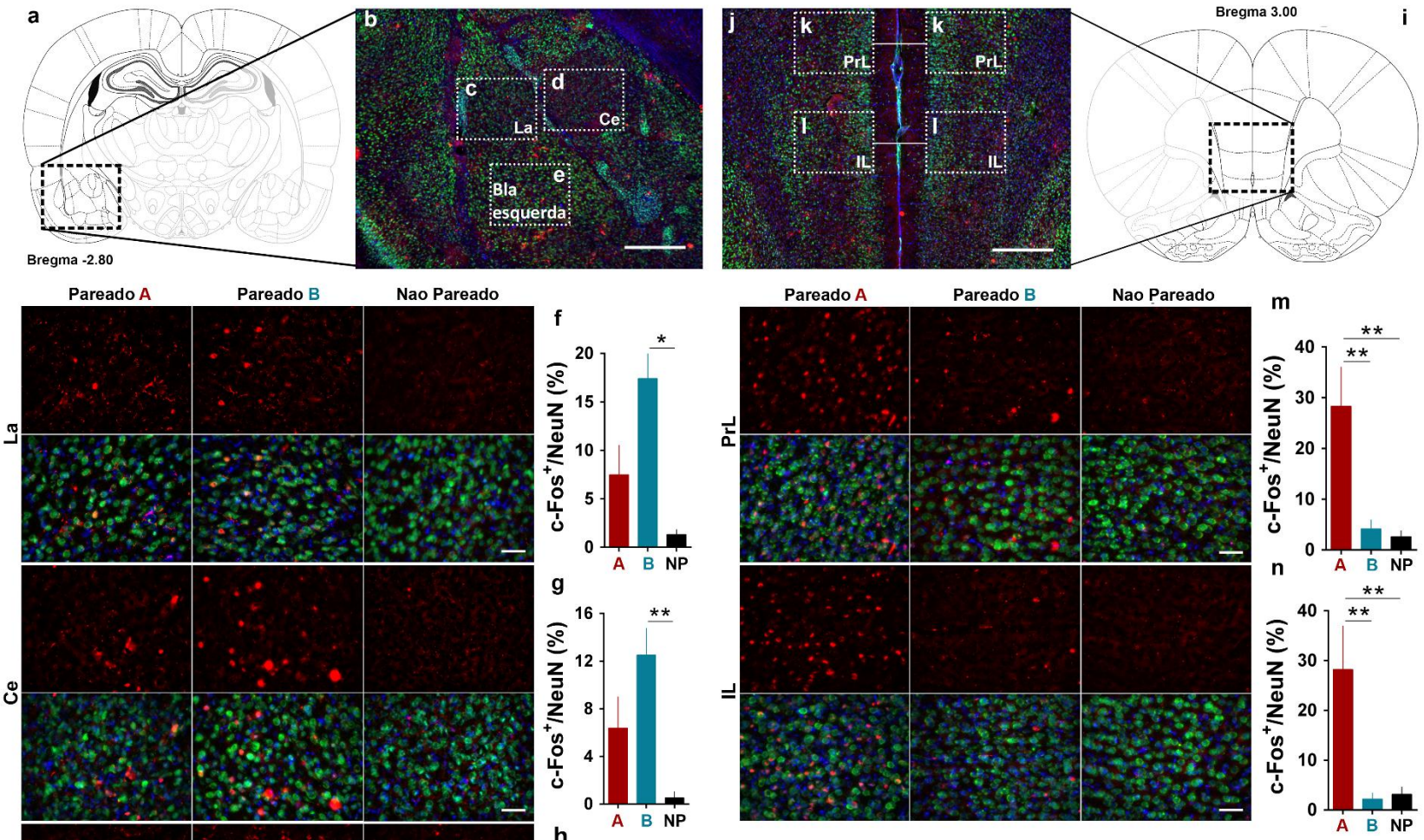


FIGURA 31: Imunofluorescência com tripla marcação no Complexo Amigdalóide e Córtex Pré-Frontal, após a reapresentação do Padrão B, no terceiro dia do teste de retenção. **a, i,** Diagramas representativos dos cortes analisados. Típicas imunofluorescências com tripla marcação (NeuN – verde, *c-Fos* – vermelho, DAPI – azul) representando aos regiões de interesse analisadas (ROI's); **b,** Complexo Amigdalóide: **c,** Lateral (La), **d,** Central (Ce), **e,** Basolateral esquerda. **j,** Córtex Pré-Frontal: **k,** Pré-Limbico (PrL), **l,** Infra-Limbico (IL); ampliação: 5x; barra de escala: 1 mm. Típica imunofluorescência com tripla marcação para todos os grupos, representado no painel inferior esquerdo: La, Ce e BLA esquerda e no painel inferior direito: PrL e IL; ampliação 40x; barra de escala: 100 µm. **f,g,h,** Gráficos apresentando a média de neurônios imunorreativos para c-Fos$^+$/NeuN em cada uma das específicas ROI's; Em todos os núcleos amigdalares analisados o grupo **Pareado B** apresentou um aumento significativo da imunoreatividade para *c-Fos* quando comparado ao grupo **Não Pareado** (**Pareado A**, vermelho n=6; **Pareado B**, azul n=7; **Não Pareado**, preto n=6. La, $F_{2,16}$ = 5,245, $p=0,017$. Ce, $F_{2,16}$ = 8,515, $p=0,003$. BLA, $F_{2,16}$ = 4,466, $p=0,028$; *$p<0,05$, **$p<0,01$). **m,n,** Em todas as regiões do Córtex Pré-Frontal medial analisadas o grupo **Pareado A** apresentou um aumento significativo da imunoreatividade para *c-Fos* quando comparado ao grupo Pareado B e ao grupo **Não Pareado** (**Pareado A**, vermelho n=6; **Pareado B**, azul n=7; **Não Pareado**, preto n=6. PrL, $F_{2,16}$ = 10,20, $p=0,001$; **$p<0,01$. IL, $F_{2,16}$ = 8,7, $p=0,002$; **$p<0,001$). Todos os resultados estão apresentados como média ± EPM.

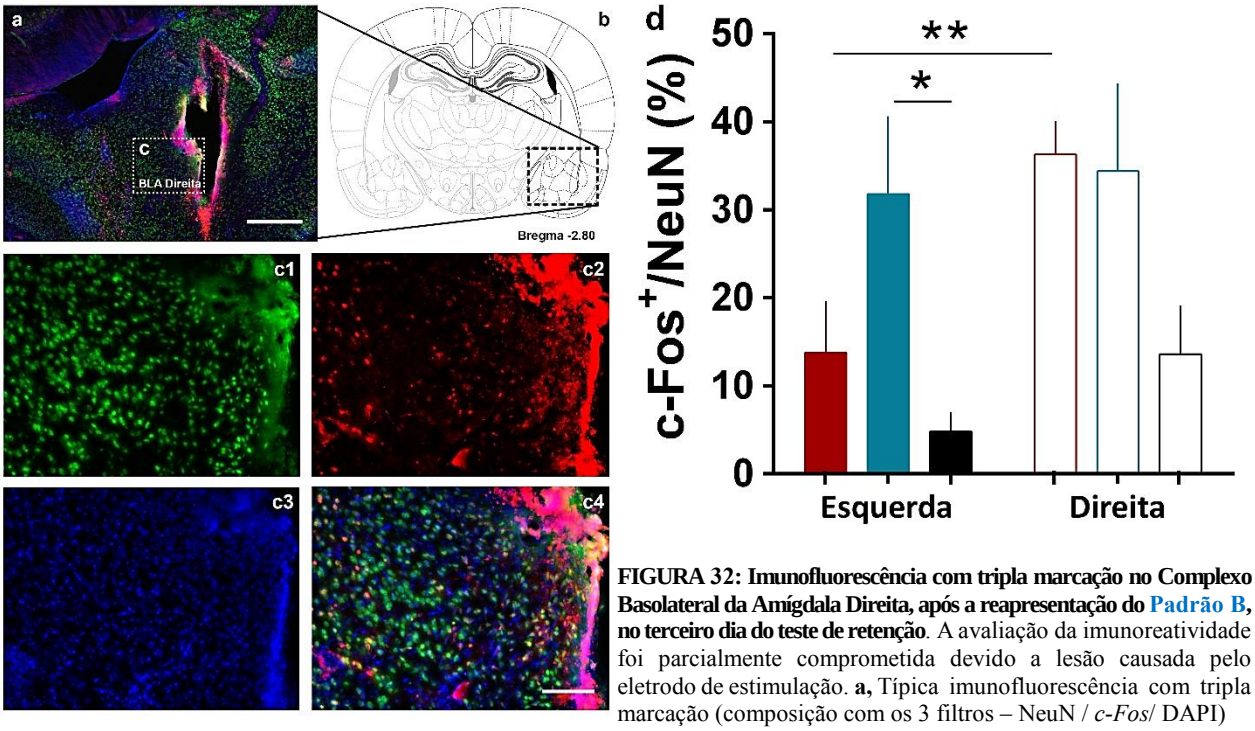


FIGURA 32: Imunofluorescência com tripla marcação no Complexo Basolateral da Amígdala Direita, após a reapresentação do Padrão B, no terceiro dia do teste de retenção. A avaliação da imunoreatividade foi parcialmente comprometida devido a lesão causada pelo eletrodo de estimulação. **a,** Típica imunofluorescência com tripla marcação (composição com os 3 filtros – NeuN / *c-Fos*/ DAPI) representando o complexo basolateral da amígdala direita; 5x; barra de escala: 1 mm. **b,** Diagrama representativo do corte analisado. **c,** filtros utilizado (c1: NeuN – verde, c2: *c-Fos* – vermelho, c3:DAPI – azul, c4: composição com os 3 filtros); ampliação 40x; barra de escala: 100 µm: **d,** Gráfico apresentando a média de neurônios imunorreativos para c-Fos^{+}/NeuN; Ambos os grupos apresentaram um aumento significativo da imunoreatividade para *c-Fos*. Entretanto em uma análise pareada entre os hemisférios cerebrais (BLAe x BLAd) apenas o grupo **Pareado A** apresentou uma diferença significativa (**Pareado A**, vermelho n=6; **Pareado B**, azul n=7; **Não Pareado**, preto n=6. BLA, $F_{2,16}$=3,050, *p=0,075; *p<0,05, **p<0,01*). Resultados como média ± EPM.

Em uma análise pareada da atividade dos substratos observa-se que no grupo **Pareado B** o Córtex Pré-Frontal apresentou uma expressão de *c-Fos* [PrL (4,15 ± 1,81%), IL (2,19 ± 1,25%)] inferior quando comparado ao complexo amigdaloide [La (17,41 ± 4,94%), BLA (31,78 ± 8,81%), Ce (12,51 ± 2,28%)] e as regiões hipotalâmicas [VMH (33,83 ± 6,53%), DMD (11,99 ± 1,75%)], com proeminente significância comparado ao núcleo basolateral [PrL (*p=0,0003*) e IL (*p<0,0001*)] e ao núcleo Ventromedial [PrL (*p<0,0001*) e IL (*p<0,0001*)] (FIGURA 33A). O grupo **Pareado A** apresentou uma resposta inversa, onde no Córtex Pré-Frontal [PrL (28,33 ± 7,78%), IL (28,20 ± 8,82%)] a expressão de *c-Fos* foi superior quando comparado ao Complexo Amigdaloide [La (7,48 ± 3,06%), BLA (13,79 ± 5,84%), Ce (6,38 ± 2,64%)] e as regiões hipotalâmicas [VMH (12,50 ± 4,92%), DMD (2,75 ± 1,13%)], com significância em comparação a Amígdala Lateral [PrL (*p=0,01*) e IL (*p=0,01*)], Central [PrL (*p=0,01*) e IL (*p=0,01*)] e Hipotálamo Dorsomedial [PrL (*p=0,002*) e IL (*p=0,002*)] (FIGURA 33B).

Por fim, correlacionando a expressão de *c-Fos* em cada substrato com a resposta condicionada de *freezing*, apenas o núcleo DMD hipotalâmico apresentou valores significativos (r=0,72; p=0,002) (FIGURA 34).

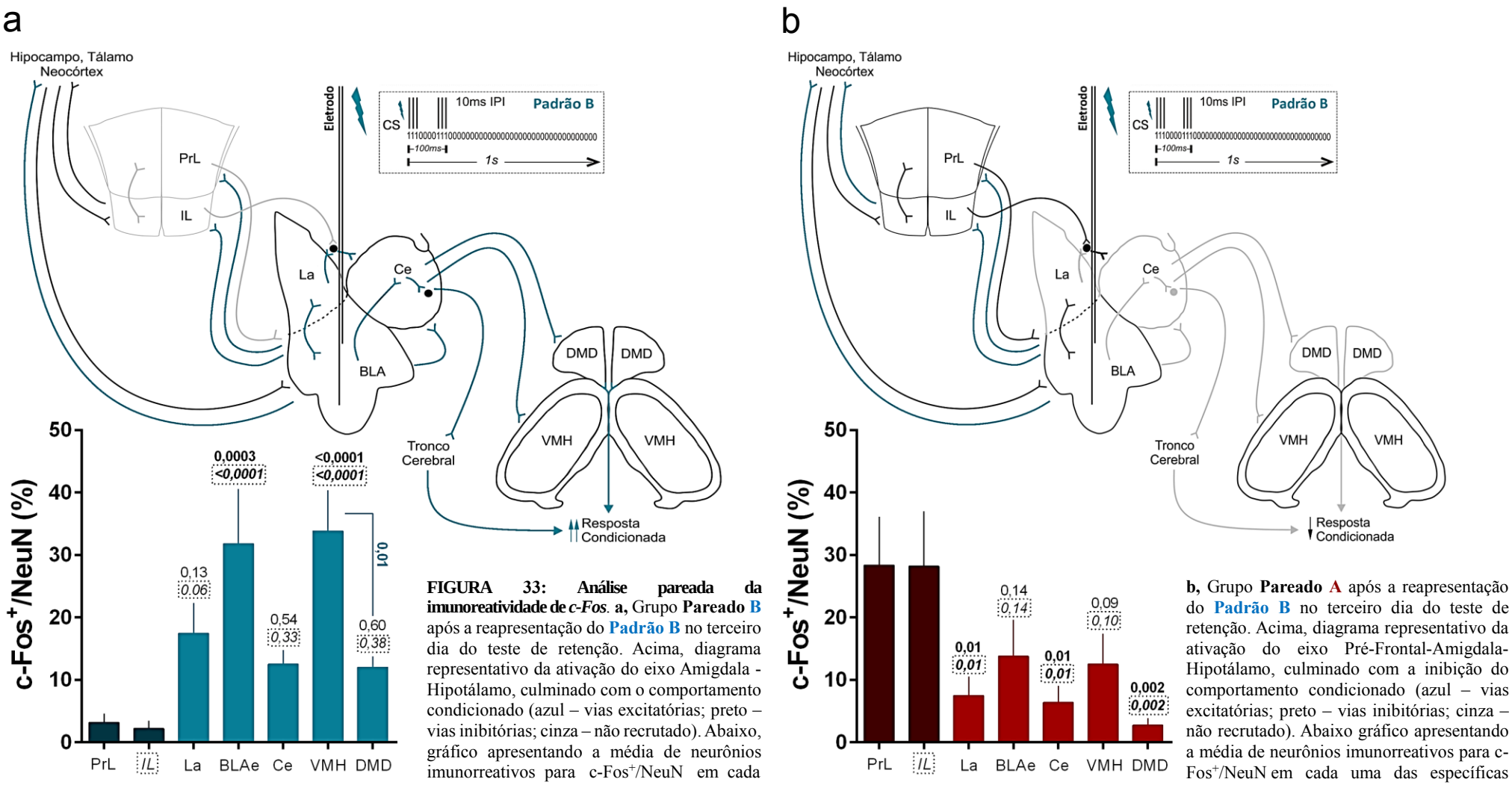


FIGURA 33: Análise pareada da imunoreatividade de *c-Fos*. a, Grupo **Pareado B** após a reapresentação do **Padrão B** no terceiro dia do teste de retenção. Acima, diagrama representativo da ativação do eixo Amigdala - Hipotálamo, culminado com o comportamento condicionado (azul – vias excitatórias; preto – vias inibitórias; cinza – não recrutado). Abaixo, gráfico apresentando a média de neurônios imunorreativos para c-Fos^{+}/NeuN em cada uma das específicas ROI's. Valores significativos em relação ao Córtex Pré-Frontal e entre os núcleos hipotalâmicos ($F_{6,36}$ = 8,74, $p<0,0001$). Todos os resultados estão apresentados como média ± EPM.

b, Grupo **Pareado A** após a reapresentação do **Padrão B** no terceiro dia do teste de retenção. Acima, diagrama representativo da ativação do eixo Pré-Frontal-Amigdala-Hipotálamo, culminado com a inibição do comportamento condicionado (azul – vias excitatórias; preto – vias inibitórias; cinza – não recrutado). Abaixo gráfico apresentando a média de neurônios imunorreativos para c-Fos^{+}/NeuN em cada uma das específicas ROI's. Valores significativos em relação ao Córtex Pré-Frontal ($F_{6,30}$ = 4,94, $p=0,0013$). Todos os resultados estão apresentados como média ± EPM.

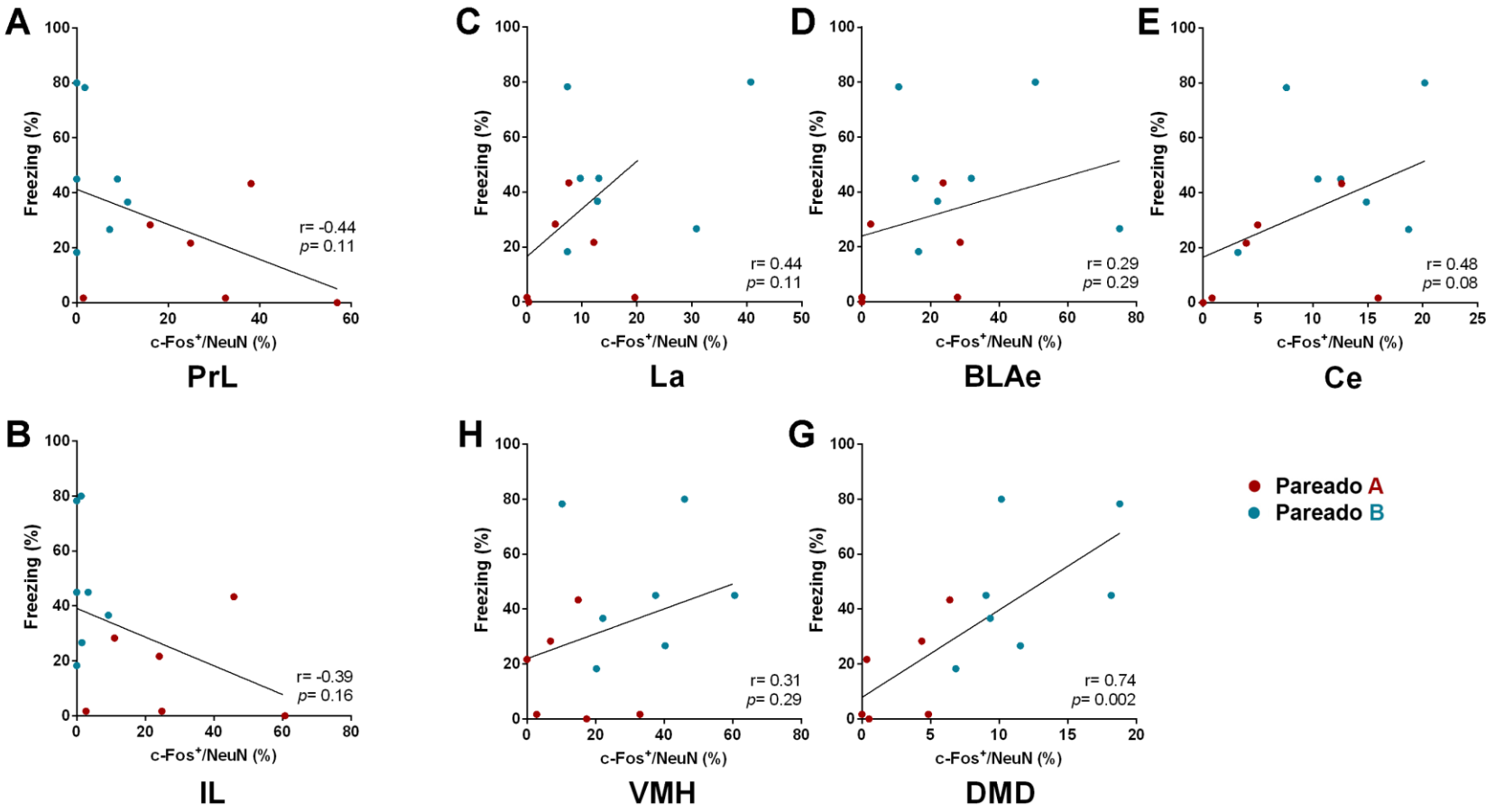


FIGURA 34: Correlação entre a imunoreatividade de *c-Fos* e o comportamento de *freezing*. Expressão de c-Fos^{+}/NeuN: **(A), (B).** Córtex Pré-Frontal [Pré-Limbico (PrL) e Infra-Límbico (IL)]; **(C-E).** Complexo Amigdaloide [Lateral (La), Central (Ce), Balolateral esquerdo (BLAe)]; **(H), (G).** Núcleos hipotalâmicos [Ventromedial (VMH) e Dorsomedial (DMD)]. Valores de **r** e **p** de acordo com Correlação de *Pearson*. **Pareado A**, n=6; **Pareado B,** n=8.

9. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, os animais foram capazes de discriminar os padrões temporais de microestimulação, dependendo do aprendizado associativo a que foram submetidos durante a fase de condicionamento.

Ao longos dos dias, a resposta comportamental condicionada foi desencadeada prioritariamente pelo padrão pareado a US. Além disso, a aplicação do padrão temporal pareado desencadeou uma maior atividade neuronal no circuito Amigdala-Hipotálamo, envolvido na resposta simpatoexcitatória de fuga e luta (De Oliveira *et al.*, 2013). Por outro lado, a aplicação de um padrão temporal até então não aprendido, ou não associado a US, não gerou uma resposta condicionada e uma atividade Amigdala-Hipotálamo significativa quando comparada ao grupo controle. Estes resultados sugerem que os padrões temporais de microestimulação elétrica (de acordo com a analogia a códigos binários em uma interface biológica de comunicação assíncrona), são capazes de ativar diferentes estados cerebrais quando associados a diferentes contingências. Dentre as possíveis interpretações, sugere-se que os distintos padrões temporais, quando associados a valências ambientais relevantes, geram a ativação de circuitos específicos, com consequentes alterações plásticas que culminam com o acoplamento funcional entre os osciladores neurais.

Em geral ressaltamos que, apesar dos padrões de microestimulação elétrica diferirem apenas em sua organização temporal, apenas um, potenciado pela tarefa associativa, desencadeou o recrutamento adequado das estruturas efetoras (substratos Amigdalo-Hipotalâmicos). O padrão não associado a valência ambiental relevante, quando aplicado, desencadeou a ativação de estruturas modulatórias (eixo Pré-Frontal-Amigdala) responsáveis pela identificação e inibição de processos tidos como inadequados a contingência pré-estabelecida. Os resultados podem ser embasados em outros trabalhos apresentados pela literatura, que apontam para o papel crucial do mPFC no reconhecimento dos estímulos ambientais, em tarefas discriminativas de aprendizado aversivo (Quirk *et al.*, 2003; Moscarello e Ledoux, 2013; Likhtik *et al.*, 2014). Além disso, podemos inferir que, caso as alterações plásticas locais fossem independentes dos mecanismos temporais descritos, ambos os padrões de microestimulação seriam capazes de evocar uma ativação semelhante dos circuitos efetores (Amigdalo-Hipotalâmicos) avaliados.

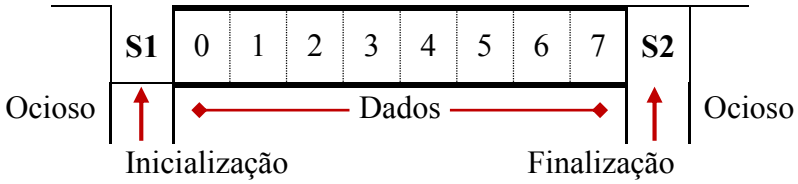
Evidências na literatura demonstram que contingências específicas podem desencadear o surgimento de patrões de atividade espaço-temporais nas redes neurais. Contingências formadas tanto por um determinado contexto ambiental quanto por um específico e isolado estímulo

sensorial (Laurent *et al.*, 1996; Normann *et al.*, 2001; Warren *et al.*, 2001; Ikegaya *et al.*, 2004). Entretanto, grande parte dos delineamentos experimentais até então publicados privilegiam o estudo da codificação temporal de certa forma passiva, ou seja, através do registro da atividade neural evocada pela apresentação de estímulos naturais.

Neste trabalho foi demonstrado, possivelmente pela primeira vez, evidências de que padrões temporais de microestimulação elétrica, com configurações mínimas de estimulação, quando aplicados em uma única região polimodal, podem recrutar de forma diferenciada circuitos neurais específicos, associados com respostas comportamentais biologicamente relevantes. A natureza aversiva da resposta comportamental avaliada e as redes neurais recrutadas pelo paradigma experimental, foram especificamente dependentes da temporização dos estímulos e da pré associação com o estímulo não condicionado.

9.1 PALAVRAS TRANSCRITAS EM CÓDIGOS BINÁRIOS

A idealização das sequências temporais utilizadas, padrões **A** e **B**, deve ser cuidadosamente discutida. Nossas "palavras" foram codificadas com 10 *bins*, com uma duração total de 100 ms. Ambos os padrões apresentaram um sinal como estímulo de inicialização (**S1**-*start*) e um outro sinal como estímulo de finalização (**S2**-*stop*), deixando livres 8 pontos para receber outros quatro estímulos, o que totaliza seis estímulos, simulando um protocolo de comunicação assíncrona. Em resumo, a análise combinatória $C_{8,4}$ permite um total de setenta combinações possíveis, o que viabiliza o teste de diferentes codificações temporais dentro de um mesmo enquadramento ou configuração.



$$Cn, p = \frac{n!}{p!\,(n-p)!}$$

Levando em consideração todas as possibilidades de codificação, hipotetiza-se que, mesmo se as sequências escolhidas fossem diferentes das atuais, as redes neurais subjacentes seriam capazes de discriminá-las. Entretanto, as configurações escolhidas para o **Padrão A**

(1001111001) e para o **Padrão B** (1110000111) podem vir a ser erroneamente interpretadas como duas diferentes organizações simplesmente por apresentarem distintos *bursts* de estimulação, onde **A** apresenta um conjunto com quatro estímulos e **B** dois conjuntos com três estímulos. Caso essa premissa fosse verdadeira infere-se que o grupo **Pareado A** poderia apresentar uma resposta condicionada potenciada com a apresentação do **Padrão B**, já que este padrão apresenta duas sequencias de estímulos e não uma como o **Padrão A**. O que de fato não aconteceu. De acordo com os resultados a apresentação de um estímulo não condicionado não foi capaz de gerar uma potenciada resposta condicionada (FIGURA 20). Além disso o IPI escolhido de 10 ms, de acordo com a literatura, é considerado tempo suficiente para uma janela de coincidência adequada sem gerar uma resposta de estimulação cumulativa (Engel e Singer, 2001). Ressalta-se ainda as características dos padrões, que apresentavam parâmetros mínimos de estimulação, como número reduzido de pulsos, baixa largura (100 μs) e amplitude (25 μA), propiciando um recrutamento de apenas um grupo pequeno de neurônios, que após o aprendizado associativo, recrutou outras redes oscilatórias com a nova apresentação do estímulo.

De fato, resultados do nosso laboratório demonstraram que em modelos animais de crise epiléptica, induzida por pentilenotetrazol (antagonista gabaérgico), a aplicação de padrões de estimulação elétrica no complexo amigdaloide, com distintas organizações temporais (4 pulsos; 600 μA, IPI ≥ 20ms), apresentam efeitos muito distintos sobre a rede neural ictogênica. Enquanto um padrão definido como periódico (4 Hz, IPI fixo = 250 ms) apresenta um efeito pró-convulsivo, um padrão temporalmente diferente, definido como não periódico (4 pulsos aleatórios, IPI ≥ 20 ms), apresenta um efeito oposto, notoriamente anticonvulsivante. Vale ressaltar que outro padrão com o mesmo número de estímulos mas também com uma diferente organização temporal (4 pulsos, IPI = 20 ms) não apresentou qualquer alteração sobre a rede neural ictogênica (Cota *et al.*, 2009). Além disso, como descrito anteriormente na introdução, padrões temporais compostos pelo mesmo número de pulsos, com a mesma amplitude e largura, mas arquitetados com distintos IPIs, podem ativar estruturas secundárias também distintas (Mesquita et al., 2011).

Por fim, inúmeras questões pertinentes a neurofisiologia da codificação temporal ainda permeiam os resultados. Dentre elas, ressalta-se o IPI dos padrões e a disposição dos estímulos. Futuras investigações buscarão a configuração mínima necessária para um processo de discriminação, consequente de um processamento diferencial por parte das redes neurais.

9.2 MAPEAMENTO DAS REDES NEURAIS PELA IMUNORRETIVIDADE (IR) DE *c-FOS* E SUAS RELAÇÔES COM O COMPORTAMENTO CONDICIONADO

Os mapas obtidos pela expressão de *c-Fos* refletem o aumento da atividade celular nos substratos neurais. Em resumo, a partir de um estímulo sensorial, natural ou artificial, a despolarização da membrana celular culmina com o aumento da sinalização de segundos mensageiros, que por sua vez eleva a expressão proteica, refletindo o recrutamento dos substratos estímulo-específicos. Ressalta-se que o pico da expressão de *c-Fos* ocorre em uma janela temporal muito específica, por volta de noventa minutos após a apresentação da estimulação (Miller *et al.*, 1984; Worley *et al.*, 1993; Knapska e Maren, 2009).

Metodologias que utilizam o mapeamento da atividade neuronal por *c-Fos,* em circuitos que intimamente participam da modulação e efetuação do medo condicionado, tem sido utilizadas classicamente pela literatura (Pezzone *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2003; Holahan e White, 2004; Knapska *et al.*, 2007; Knapska e Maren, 2009). De acordo com a metodologia proposta, concomitantemente ao complexo amigdalóide, foi avaliado o córtex pré-frontal medial (Quirk *et al.*, 2003) e alguns subnúcleos hipotalâmicos mediais (Canteras, 2002).

Apesar dos trabalhos apresentarem evidências semelhantes quanto as propriedades funcionais dos substratos, variações na expressão de *c-Fos* costumam ser apresentadas. Por exemplo, algumas evidências demonstram que a atividade em La e Ce pode ser atribuída tanto a CS quanto a US, mas especialmente a US, ao passo que a atividade em BLA pode ser atribuída principalmente a CS (Pezzone *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 2001). Esta informação corrobora com os resultados onde a maior atividade de c-Fos^{+}/NeuN em BLAe, apesar de não significativa, apresentou-se consideravelmente maior em relação a La e Ce, demonstrando seu importante papel na categorização e processamento dos estímulos (FIGURA 33).

Quanto as correlações, apenas a atividade em DMD hipotalâmico apresentou-se significativamente correlacionado ao comportamento condicionado, uma vez que este substrato está diretamente envolvido com a efetuação de comportamentos defensivos (Canteras, 2002). Muito embora a correlação do comportamento condicionado com a atividade celular nos outros substratos avaliados não tenha sido significativa, dentro de um critério de probabilidade convencionado como significativo, podemos observar que os valores de *r* estão de acordo com a hipótese de reconhecimento e discriminação dos padrões temporais. Os substratos amigdalares apresentam correlações positivas, ou seja quanto maior a ativação, maior o comportamento

condicionado e mPFC correlações negativas, ou seja quanto maior a ativação, menor o comportamento condicionado (FIGURA 34).

Ainda, observando o resultado comportamental, em paralelo a atividade neuronal, observa-se o grupo **Parado A** apresentou valores de *freezing* e de expressão de c-Fos^{+}/NeuN no complexo amigdaloide, intermediários entre o grupo **Não Pareado** e o Grupo **Pareado B**. Criticando o delineamento experimental é possível que um condicionamento de segunda ordem contextual ou um possível processo de extinção da memória aversiva possa ter influenciado os resultados, afinal os estímulos foram apresentados de forma repetitiva, ao longo de dias subsequentes, dentro de um mesmo contexto ambiental.

Alem disso, considerando o comportamento e o complexo amigdaloide, os resultados podem ter sido comprometidos não só pela sua dispersão, intrínseca a uma avaliação comportamental, mas também pela complexidade inerente ao processamento envolvido em uma tarefa de condicionamento ao medo (Holahan e White, 2004). Tarefa gerenciada por um conjunto de estruturas que trabalham em paralelo, mas que não necessariamente apresentam uma relação estritamente linear entre si e com uma resposta motora condicionada. Nesse sentido é possível que o aumento da atividade no complexo amigdaloide no grupo **Parado A** tenha sido causado por recíprocas projeções excitatórias junto ao mPFC. Projeções que são cruciais para o processamento da informação, envolvidas na categorização da valência emocional atribuída as contingências específicas. (Marek *et al.*, 2013).

É importante salientar que a metodologia de estimulação escolhida apresenta uma limitação. Embora os eletrodos de aço inoxidável, bipolares, tenham sido projetados com uma pequena area de exposição (1 mm) (FIGURA 15), a fim de aumentar a especificidade do alvo estimulado, fibras de passagem ou outros subnúcleos amigdaloides também podem ter sido ativados (FIGURA 19), obtendo-se assim uma maior variabilidade. Contudo, diferentes metodologias de estimulação, consideradas muito mais específicas em termos de ativação neuronal, também descreveram uma maior variabilidade nos resultados comportamentais. Corroborando com os achados, uma maior variabilidade pode ser encontrada quando a estimulação é realizada diretamente sobre os corpos celulares do complexo basolateral da amigdala (Stuber *et al.*, 2011).

De uma maneira muito interessante, o grupo controle **Não Pareado**, apesar de submetido ao mesmo protocolo de estimulação, apresentou uma baixa atividade neuronal em todos os

substratos avaliados. Além disso, ao longo de todos os dias de testes de retenção, não foi encontrado nenhuma diferença estatística na análise comportamental. Neste caso, uma vez que a microestimulação não foi apresentada em momento algum, concomitantemente pareada ao estímulo aversivo, infere-se que nenhuma relevância emocional foi atribuída aos padrões temporais de microestimulação elétrica. O valor emocional atribuído ao padrões foi estritamente consolidada pela associação direta com o estímulo não condicionado. Ressalta-se ainda, mais uma vez, que o processo discriminativo foi uma consequência da organização temporal dos pulsos, salvo que todos os outros atributos de estimulação, como o número, a amplitude e o comprimento de onda, eram necessariamente semelhantes.

Como descrito anteriormente, o aumento da atividade em mPFC pode vir a representar sua participação no reconhecimento do Padrão não condicionado. Contudo, apesar de alguns trabalhos, que avaliam os substratos envolvidos no condicionamento ao medo, lidarem com o mPFC como um todo (Quirk *et al.*, 2003; Likhtik *et al.*, 2014), PrL e IL podem ser caracterizados com distintas funções na modulação da resposta condicionada. Pelas diferentes projeções junto ao complexo amigdaloide atribui-se PrL a facilitação da resposta condicionada, ao passo que IL com a inibição (Vidal-Gonzalez *et al.*, 2006).

Contrariando a expectativa de uma possível ativação diferenciada, ambos os substratos, PrL e IL, foram igualmente ativados, ou inibidos, quando o padrão temporal foi reapresentado. De fato, se mPFC está envolvido tanto na facilitação quanto na inibição da resposta condicionada, PrL e IL deveriam ter apresentado uma ativação diferencial nos grupos (**Pareado A** e **Pareado B**), em resposta a reapresentação do **Padrão B**.

Reavaliando a literatura, observa-se que a dicotomia funcional entre PrL e IL tem sido prioritariamente evidenciada em paradigmas tradicionais de condicionamento ao medo, ou seja, pela associação de um único estímulo a US (Vidal-Gonzalez *et al.*, 2006). Em paradigmas discriminativos, evidências demonstraram que a inibição farmacológica diferenciada, de PrL ou IL, não foi capaz de alterar o processo de aquisição, mas igualmente interrompeu a discriminação dos estímulos (CS+ e CS-). A reapresentação tanto de CS+ quanto de CS-, com PrL ou IL inibidos, desencadeou uma significativa resposta condicionada. Conclui-se que mPFC está envolvido mais na modulação negativa do que na modulação positiva ou manutenção da resposta aversiva (Lee e Choi, 2012).

Além disso, de acordo com a mesma crítica ao delineamento experimental, uma

possibilidade pode ser levantada. Em tarefas discriminativas PrL e IL podem ter sido concomitantemente recrutados, com variados graus de ativação, uma vez que uma sessão de extinção sempre antecedeu ou sucedeu um processo de evocação, ou seja, em um mesmo contexto sessões de caráter inibitório foram intercaladas com sessões excitatórias ao longo de três dias.

Por fim, estes primeiros resultados deram início a uma longa jornada de descarte da hipótese nula, uma vez que padrões temporais de microestimulação elétrica podem carrear uma determinada informação, conduzindo de forma dinâmica o acoplamento complexo de circuitos oscilatórios, envolvidos no surgimento de um estado de funcionamento cerebral (FIGURA 26).

10. CONCLUSÃO

Nossa interface de "comunicação serial assíncrona" foi capaz de desencadear a emergência de estados cerebrais, dependendo da sequência binária previamente programada durante um paradigma de aprendizado associativo.

Um único eletrodo, posicionado em um substrato caracteristicamente polimodal e associativo como o complexo amigdaloide, pode recrutar diferentes circuitos relacionados a modulação da memória aversiva.

Respostas comportamentais distintas podem ser desencadeadas simplesmente pela reorganização temporal de seis pulsos, representados como um código binário.

11. PERSPECTIVAS

1. ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA DA INTERAÇÃO ENTRE O CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E O COMPLEXO AMIGDALOIDE DURANTE PARADIGMA DISCRIMINATÓRIO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO

SINTESE DA PROPOSTA

De acordo com as presentes evidencias, um único eletrodo de microestimulação, posicionado no complexo basolateral da amígdala, pode recrutar diferentes circuitos neurais, além de promover a execução de comportamentos diferentes. Os padrões aplicados e associados ao comportamento de *freezing* foram discriminados simplesmente pela reorganização temporal de seis pulsos, representados como um código binário. Ainda, de acordo com as premissas, esta interface de "*comunicação serial assíncrona"* pode ser capaz de desencadear o surgimento de diferentes estados de funcionamento cerebral, dependendo do código temporal previamente programado durante uma tarefa de memória associativa.

Apesar dos resultados apresentarem ótimos indícios de que padrões de microestimulação elétrica temporalmente codificados, quando associados a valências emocionalmente relevantes, podem recrutar circuitos neurais responsáveis pela associação, interpretação e modulação da informação, as presentes evidencias ainda deixam em aberto inúmeras questões. Dentre elas, como as estruturas estudadas dinamicamente interagem entre si, diferenciando estados de funcionamento cerebral relacionados a memória de medo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Registrar a atividade multiunitária do complexo basolateral da amígdala simultaneamente a atividade do Córtex Pré-Frontal medial, durante o paradigma discriminatório de condicionamento ao medo
- Analisar durante o paradigma discriminatório de condicionamento ao medo o sincronismo entre as regiões registradas, dentro de frequências de oscilação eletroencefalográficas previamente definidas (teta/gama)
- Analisar durante o paradigma discriminatório de condicionamento ao medo o surgimento de sequências de atividade temporalmente síncronas (com alta confiabilidade temporal) associadas ao padrão temporal de microestimulação elétrica
- Correlacionar os dados eletrofisiológicos ao comportamento de congelamento (robusta resposta comportamental de fuga ou luta relacionada a memória de medo)

CIRURGIA PARA IMPLANTE DE ELETRODOS

Os animais serão anestesiados com uma mistura anestésica gasosa de isoflurano (0,5 a 0,8%) em oxigênio ou com uma solução de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) intraperitoneal e localmente na região do escalpo com uma solução de Lidocaína Cloridrato + Epinefrina (2%) (recomendações do comitê de ética no uso de animais da UFMG (CEUA-UFMG), sendo então submetidos à cirurgia estereotáxica (Estereotáxico *Stoelting* Co., Wood Dale, IL, USA).

Eletrodos bipolares para microestimulação (µA, 1 mm, ponta a ponta), construídos a partir de um par de fios de tungstênio (*Blunt tungst electr*, 3Meg, 0.008in, pkg/12), guiados por uma sílica fundida, serão cirurgicamente implantados no complexo basolateral da amígdala direita (BLAd: referência a partir do bregma: AP: -2,8, LL: -4,8, DV: -9,4)(Paxinos e Watson, 2007). Os eletrodos serão soldados em uma placa de circuito impresso, que por sua vez, será soldada em um micro conector (Omnetics© nano 18-pin *Dual rown header female*).

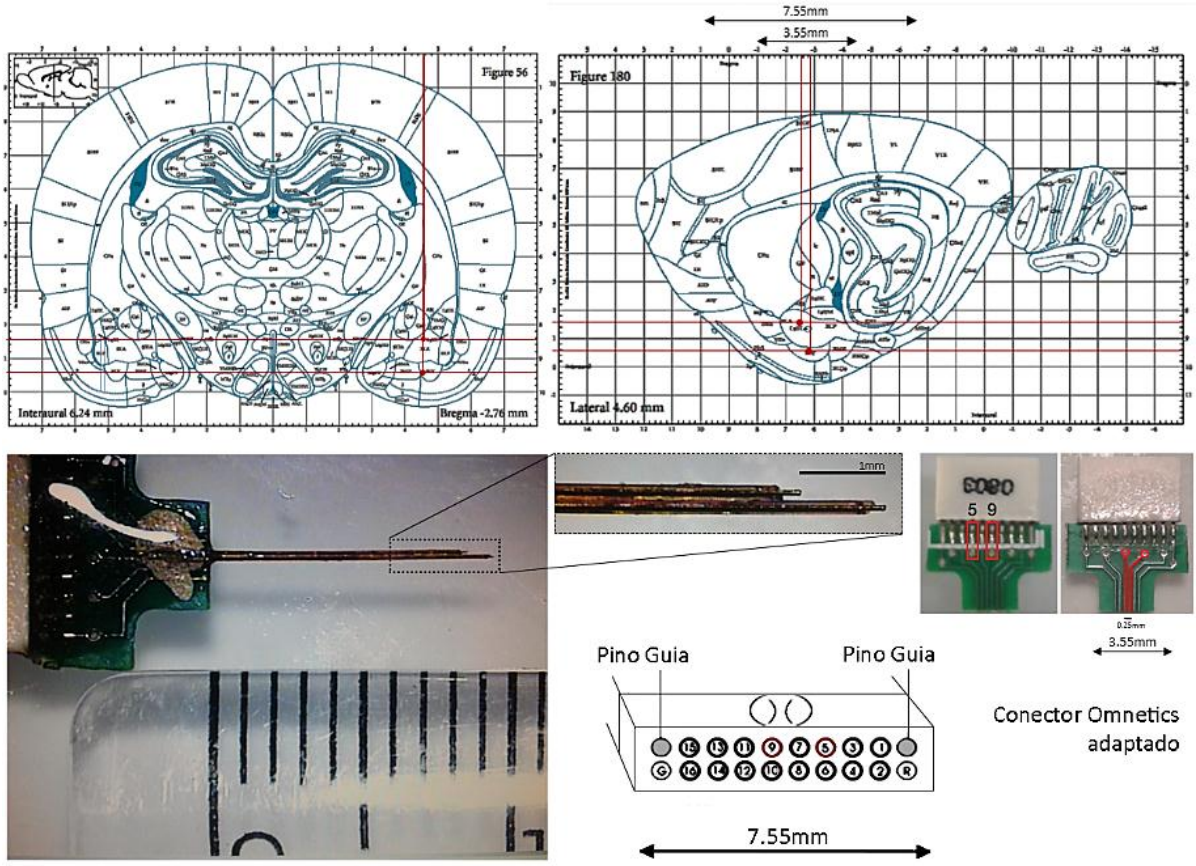


FIGURA: **Acima:** Diagrama anatômico. Posicionamento do eletrodo de microestimulação na BLAd (AP: -2,8, LL: -4,8, DV: -9,4). **Abaixo:** Placa, conector (Omnetics©) e configuração dos eletrodos bipolares para microestimulação.

Os eletrodos para o registro multiunitário serão confeccionados da mesma forma que os eletrodos de microestimulação, sendo que doze canais serão igualmente distribuídos, bilateralmente, nos substratos Pré-Limbico (PrL, 6 canais) e Infra-Limbico (IL, 6 canais) do Córtex Pré-Frontal medial [mPFC: referência a partir do bregma: AP: 3,2, LL: +1,4/0/-1,4, DV: 5(IL)/3,8(PrL)] (Paxinos e Watson, 2007) e dezesseis canais serão posicionados no Complexo Basolateral da Amígdala Esquerda (BLAe: referência a partir do bregma: AP: -3, LL: +4,6, DV: -9,4).

A descida dos eletrodos sobre as regiões alvo será realizada a uma velocidade constante (~200 µ/min) através de um sistema automatizado de descida e/ou subida acoplado a um micromanipulador (APENDICE). Os conjuntos de eletrodos para microestimulação elétrica e registro serão fixados no crânio com cimento de zinco e posteriormente revestidos com acrílico de dentista. Ao final, os animais serão tratados com solução pentabiótica (17 mg/kg) e anti-inflamatória (5 mg/kg) intramusculares, seguindo para um período de recuperação de 5 a 7 dias.

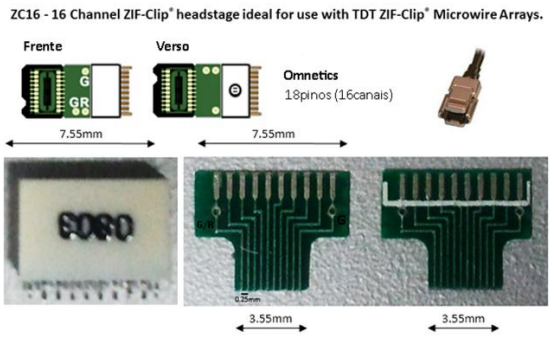


FIGURA: **Acima:** Configuração do *Headstage* (Omnetics© - Ganho 1x, Peso 2,6 g Conector 1 x Mini-DB26, Pins 20-pin). **Abaixo:** conector e placa onde o eletrodo será soldado.

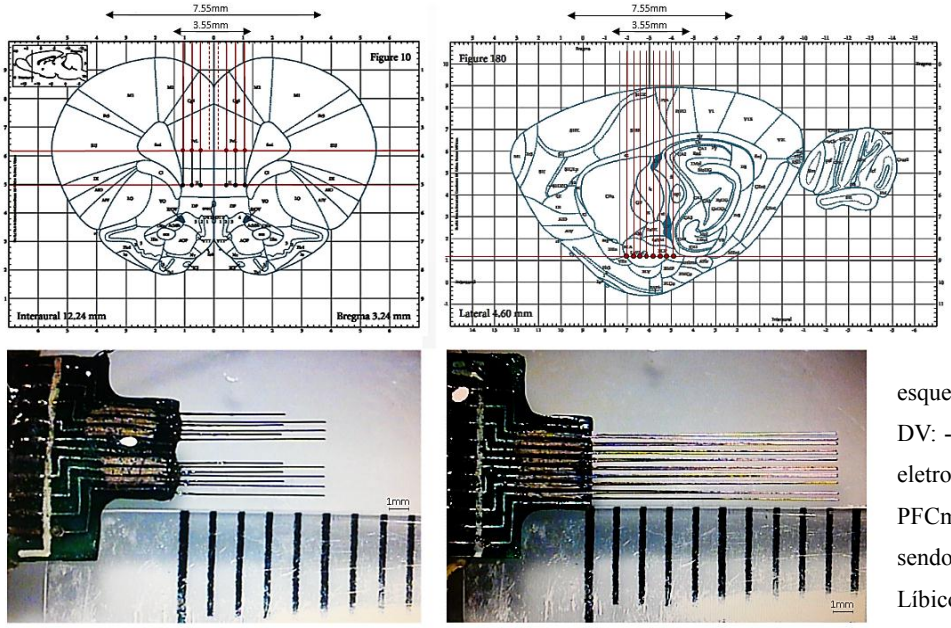


FIGURA: **Acima:** Diagrama anatômico. Posicionamento dos eletrodos de registro. *Esquerda:* Córtex Pré-Frontal [PFCm - AP: 3,2, LL: +1,4/0/-1,4, DV: 5(IL) / 3,8 (PrL)]. *Direita:* Complexo basolateral da amigdala esquerda [BLAe AP: -3, LL: +4,6, DV: -9,4] **Abaixo:** Configuração dos eletrodos para registro. *Esquerda:* PFCm (registro bilateral 12 eletrodos sendo 6 (Pré-Límbico) e 6 (Infra-Líbico). *Direita:*BLAe (16 eletrodos).

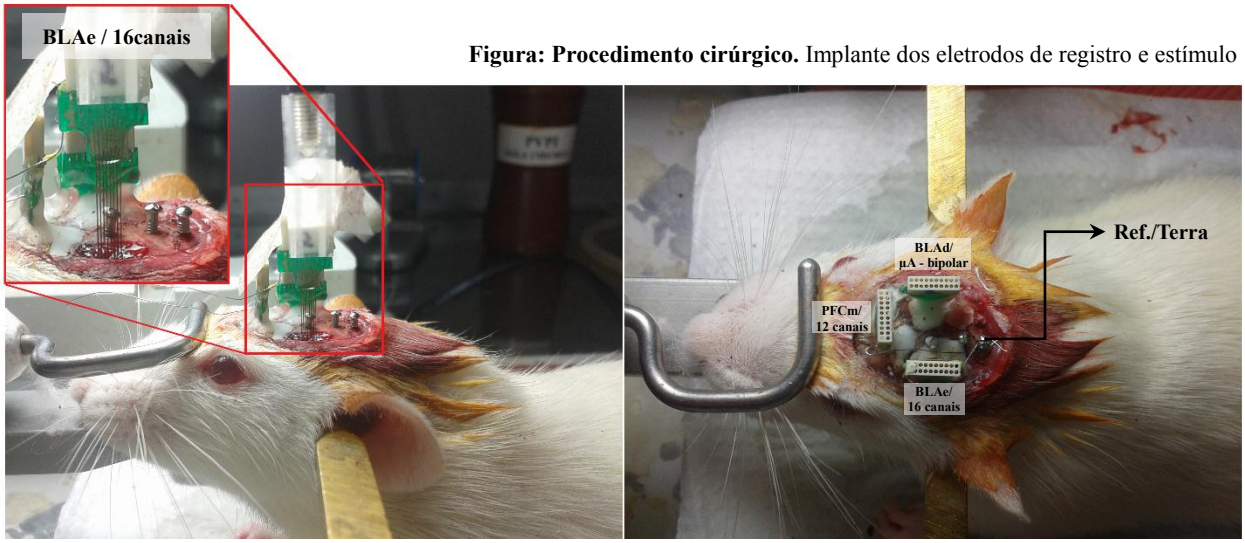


Figura: Procedimento cirúrgico. Implante dos eletrodos de registro e estímulo

ELETROFISIOLOGIA

MICROESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

Os padrões de microestimulação elétrica serão inicializados a partir de sinais de "*trigger*" (Pulsos TTL: com tensão, comprimento de onda e intervalos inter-pulso (IPI) programáveis, gerados pela interface RpvdsEx. Tucker-Davis Technologies) direcionados a um gerador comercial de corrente elétrica (DIGITIMER Ltd – *Isolated Stimulator Model DS4 with Biphasic Constant Current output*) que gera pulsos quadráticos, bifásicos, com amplitude programável.

AQUISIÇÃO

Os registros serão obtidos através de um estágio préamplificado de ganho unitário (ganho 1x. adaptador ZCA-AMN16. Omnetics©) acoplado a um fino cabo de registro (ZC16 – 16 canais ZIF CLIP. Omnetics©). Os registros unitários e multiunitários (*spikes*) em ambos os substratos, mPFC e BLAe, serão isolados por limiares automáticos (definidos pela interface de registro RpvdsEx. Tucker-Davis Technologies) e filtrados por um filtro de 600 a 6000Hz. Os potenciais de campo (LFP) de ambos os substratos serão registrados a partir do eletrodo de referência e filtrados por um filtro na banda de 1 a 2000 Hz, amplificados 24000 V/V. Ambos os sinais, unitários e LFP, serão adquiridos por um sistema de amplificação (Tucker-Davis Technologies RZ2) acoplado em

uma estação de trabalho (DELL Precison T3400) onde está instalado o programa de aquisição (RpvdsEx. Tucker-Davis Technologies).

ANÁLISE

Os dados serão exportados para o programa Matlab® e os resultados serão obtidos através rotinas desenvolvidas no próprio laboratório, associadas a um pacote de análises pronto com rotinas pré desenvolvidas (EEG lab. *Open source environment for electrophysiological signal processing* - http://sccn.ucsd.edu/eeglab/).

PARADIGMA DISCRIMINATÓRIO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO

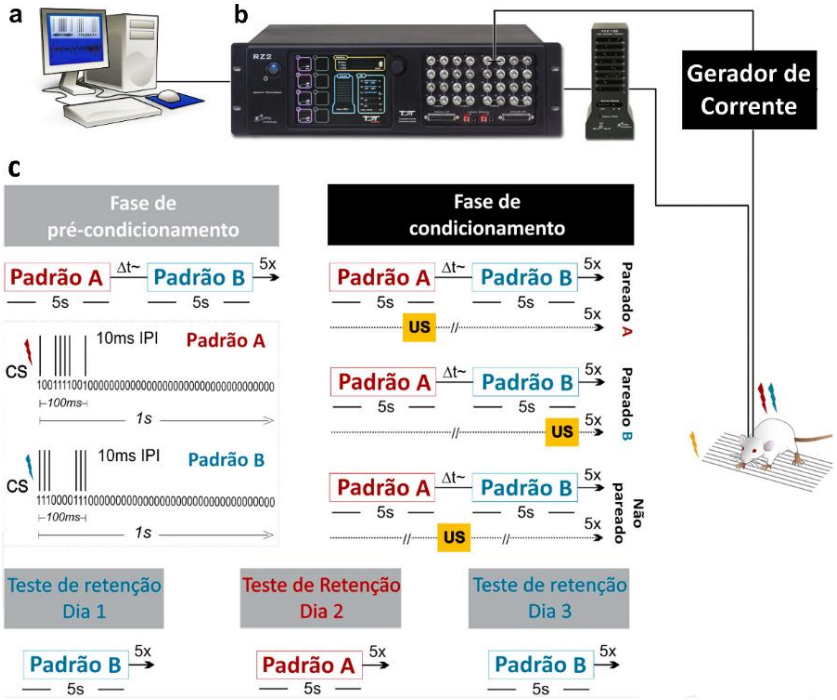


FIGURA: Setup experimental e parâmetros de condicionamento. a, Setup experimental. **b, Plataforma Tucker-Davis Technologies RZ2:** Registro da atividade multiunitária e acionamento dos padrões temporais de microestimulação junto ao gerador de corrente **c,** PARADIGMA DISCRIMINATÓRIO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO. Discriminação de duas sequências binárias de microestimulação elétrica, **Padrão A** ou **Padrão B**. Três grupos submetidos à fase de condicionamento, com diferentes pareamentos entre os padrões e **US**: **Pareado A** e Não **Pareado B**, Não **Pareado A** e **Pareado B** e **Não Pareado A** e **Não Pareado B**. A resposta condicionada será avaliada por três dias consecutivos onde um código binário será apresentado por dia: Dia 1 - **B**; Dia 2 - **A**; Dia 3 - **B**.

COMPORTAMENTO CONDICIONADO

O comportamento condicionado de *freezing* será analisado através de vídeos gravados por uma câmera posicionada em frente às caixas. Todos os vídeos serão analisados *off-line* por um examinador cego.

2. INTEGRAÇÃO DE UM SISTEMA SENSORIAL ARTIFICIAL À RESPOSTA MOTORA DE RATOS

SINTESE DA PROPOSTA

Como nova hipótese propomos que o comportamento motor exploratório de ratos pode ser guiado por estímulos sensoriais artificiais, aplicados no complexo basolateral da amígdala. Estes estímulos serão formados pelos padrões temporais de microestimulação elétrica utilizados em nossa primeira hipótese. A escolha dos padrões aplicados serão determinados por um processamento computacional e acionados pelo sinal de um receptor sensorial artificial acoplado ao animal.

Esta nova hipótese fundamenta-se na característica integradora de informações do complexo amigdaloide que, como descrito anteriormente, é capaz de estabelecer relevância a estímulos e a eventos de diferentes valências (Davis e Whalen, 2001).

Vale ressaltar que diferentes padrões de microestimulação elétrica quando aplicados em um substrato neural, de caráter polimodal e integrativo, sem uma associação direta a nenhuma modalidade sensorial, pode permitir a possibilidade do desenvolvimento de uma nova forma de comunicação. Este sistema requer o desenvolvimento de soluções tecnológicas para a aplicação em tempo real da microestimulação, mimetizando o funcionamento de estruturas mais caudais da via, de características monomodais, mas sem evocar processos sensoriais já existentes. No caso, um real sentido artificial, ao contrário do proposto pela literatura (Thomson *et al.*, 2013).

Para testar esta nova hipótese, protocolos de condicionamento operante serão utilizados objetivando assim responder se diferentes padrões temporais de microestimulação elétrica são capazes gerar alterações plásticas, ao ponto de, funcionalmente guiarem o comportamento exploratório pela busca de uma recompensa.

O comportamento operante envolve o movimento voluntário, consequente de comandos motores especializados, que culmina com a ação de músculos, sendo controlado pelas suas consequências. Neste contexto, se a consequência for reforçadora aumenta-se a probabilidade de ocorrências, se for punitiva, além de diminuir a probabilidade de sua ocorrência futura

gera efeitos colaterais, como por exemplo, ansiedade e depressão (Skinner, 1938; Skinner, 1966). Assim, o comportamento motor de exploração será condicionado através da associação de um determinado padrão de microestimulação elétrica a uma recompensa.

A eficácia do condicionamento poderá ser verificada pelo aumento significativo do comportamento exploratório (integração sensório-motora) e futuramente pelo registro da atividade elétrica dos substratos envolvidos.

SETUP DE CONDICIONAMENTO OPERANTE

Para a realização dos protocolos de condicionamento operante foi construído um sistema capaz de gerar e controlar a temporalização dos estímulos elétricos (descrito anteriormente), associado à emissão e recepção dos sinais físicos ambientais e a apresentação de recompensas (APÊNDICE).

O sinal físico ambiental será baseado em um sistema gerador de pulsos de radiação infravermelha. Este sistema será posicionado em plataformas de acrílico que conterão as recompensas guardadas em pequenas gavetas. Estes compartimentos podem se abrir com o auxílio de um pequeno motor. Os receptores de infravermelho serão acoplados ao animal experimental como receptores sensoriais artificiais.

Durante a tarefa, quando o animal alinha o receptor frente a um emissor, um determinado padrão de microestimulação elétrica é acionado, sinalizando a presença da recompensa. Após um tempo de exploração do alvo, associado à microestimulação previamente definida pelo experimentador, a recompensa é apresentada automaticamente ao animal.

Todo o sistema de "*hardware*" e configuração dos parâmetros experimentais é controlado via "*software*" (APÊNDICE).

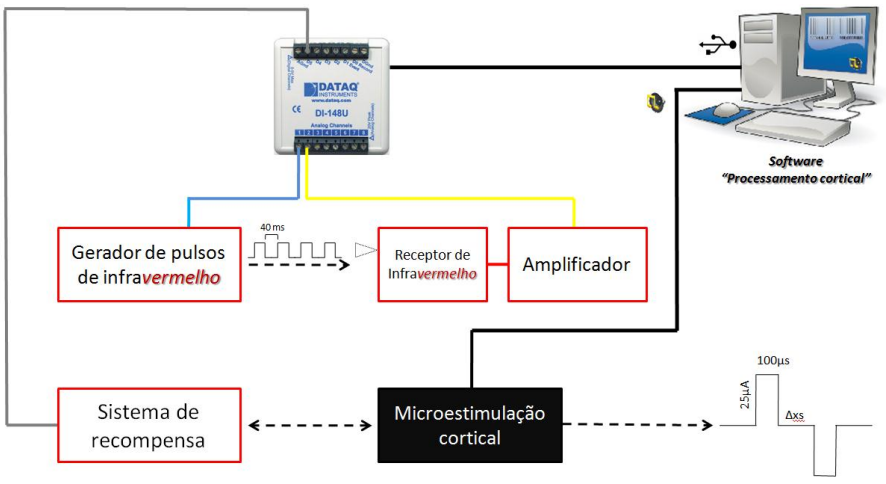
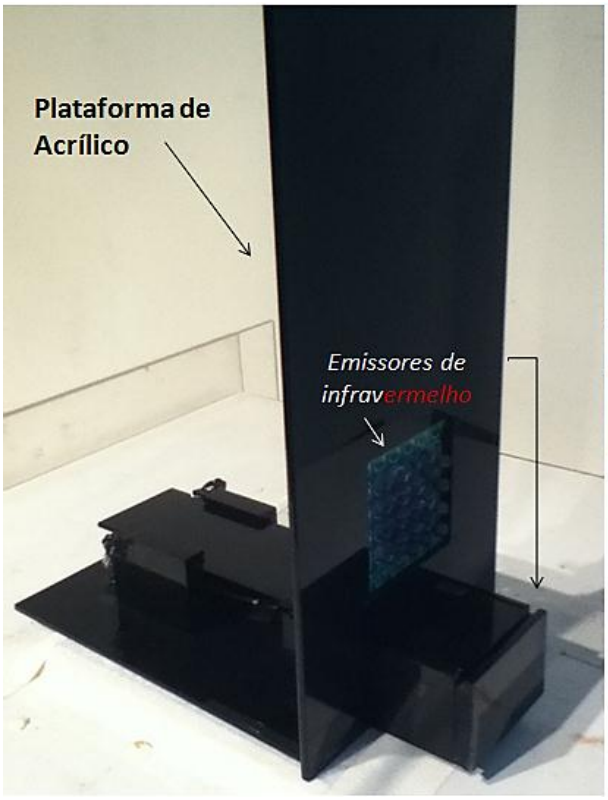


FIGURA: Esquemático do sistema de controle, emissão, recepção e retroalimentação baseado na microestimulação elétrica.



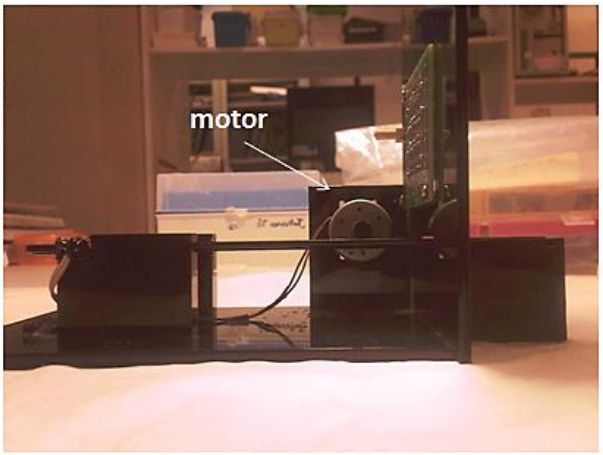


FIGURA: Plataforma de acrílico com os emissores de infravermelho, compartimento para colocação das recompensas, e motor para abertura do compartimento

Setup de microestimulação

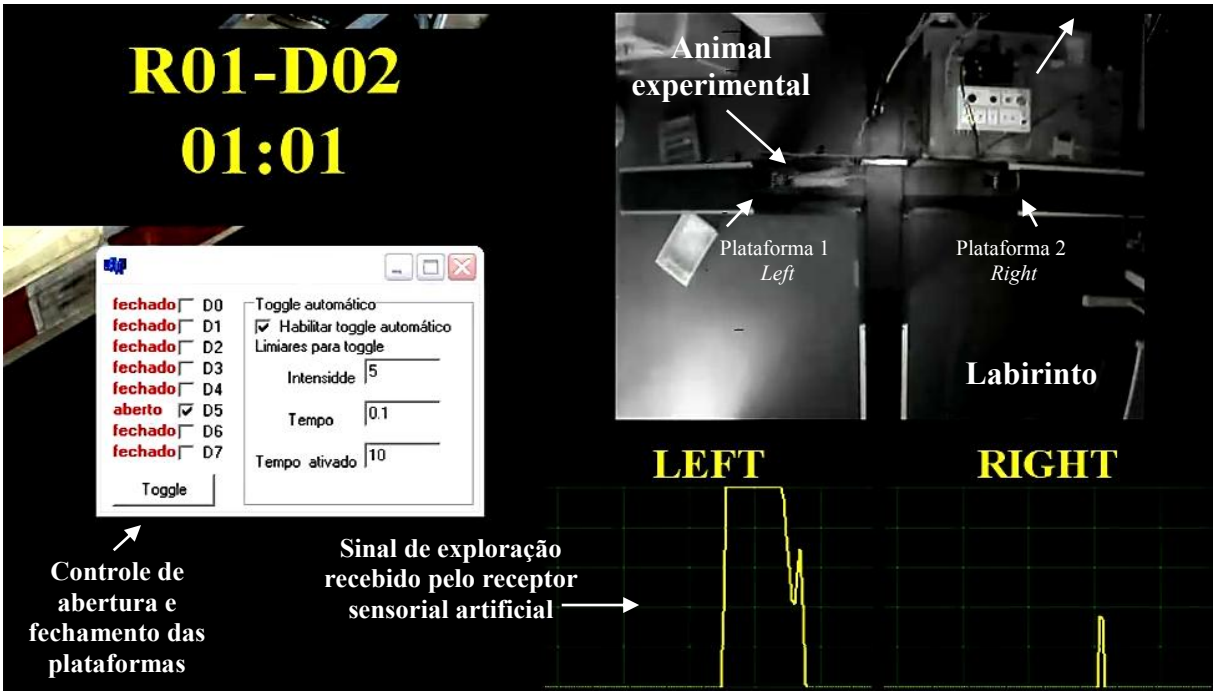


FIGURA: Software de controle. Visão geral da tela para o acompanhamento do animal durante o protocolo experimental.

CONDICIONAMENTO OPERANTE

CIRURGIA PARA IMPLANTE DE ELETRODOS/RECEPTOR SENSORIAL ARTIFICIAL

Toda a cirurgia segue os mesmo passos da realizada para o condicionamento clássico, salvo que, acoplado ao conector RJ11 associamos um sensor/receptor de infravermelho, o receptor sensorial artificial (940 nm – modelo: *Photonic PHFT380B*). O receptor é um componente eletrônico (diodo) que capta, dentro um campo definido de recepção (± 20º), a radiação infravermelha enviada pelos emissores.

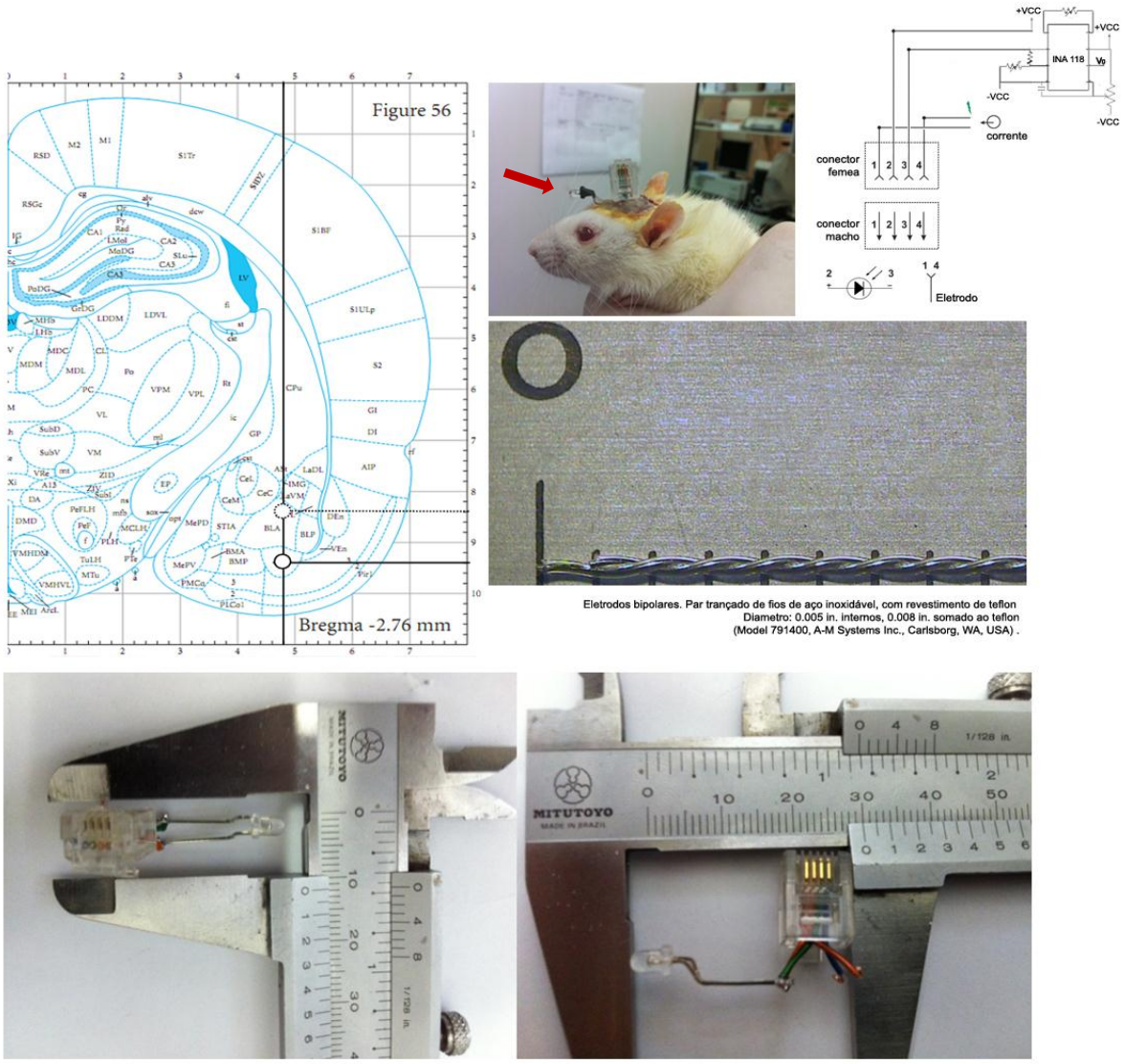


FIGURA: Receptor sensorial artificial. Receptor de infravermelho acoplado a um conector RJ-11. Sinal amplificado por um circuito associado ao um amplificador INA118.

MICROESTIMULAÇÃO ELÉTRICA COMO RETROALIMENTAÇÃO SENSORIAL PARA O COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA

De forma geral os animais serão separados em dois grupos e, após um período de treinamento, ambos serão apresentados aos dois padrões temporais de microestimulação, salvo que, o grupo **A** receberá a recompensa apenas com o reconhecimento do **Padrão A** e o grupo **B** receberá a recompensa apenas com o **Padrão B**. A apresentação dos padrões será randomicamente distribuídas ao longo da sessão.

Todo o protocolo será realizado em um labirinto composto por um simples corredor, onde as plataformas de apresentação das recompensas serão posicionadas em cada uma de suas duas extremidades. Quando o animal, durante a exploração, alinhar o receptor artificial frente ao emissor, o padrão de microestimulação será acionado, sinalizando a possibilidade de recebimento da recompensa. Após 1 s de alinhamento entre emissor e o receptor, associado a microestimulação, a recompensa será apresentada, permanecendo exposta por 5 s.

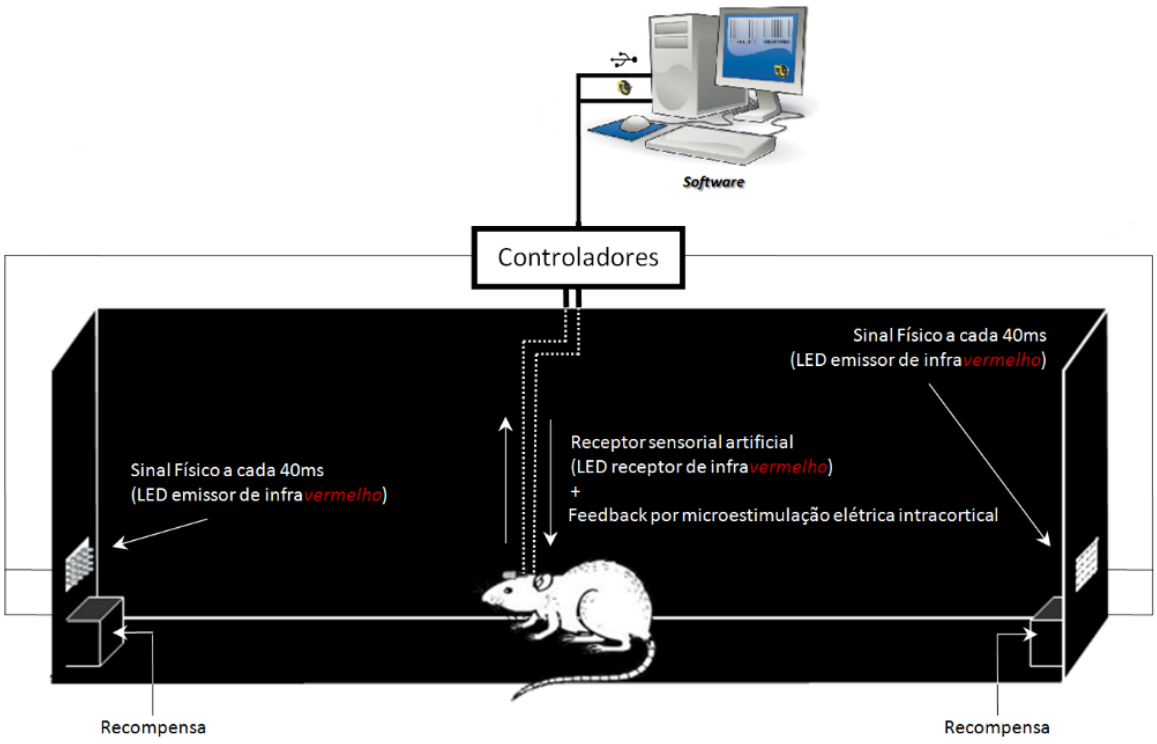


FIGURA: Protocolo de condicionamento operante. Retroalimentação sensorial para o complexo basolateral da amígdala. Discriminação de padrões temporais de microestimulação elétrica.

12. REFERENCIAS

ABELES, M. **Corticonics : neural circuits of the cerebral cortex**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

ADOLPHS, R. Neural systems for recognizing emotion. **Curr Opin Neurobiol,** v. 12, n. 2, p. 169-77, Apr 2002.

ADRIAN, E. D. The impulses produced by sensory nerve endings: Part I. **J Physiol,** v. 61, n. 1, p. 49-72, Mar 18 1926.

ADRIAN, E. D.; ZOTTERMAN, Y. The impulses produced by sensory nerve-endings: Part II. The response of a Single End-Organ. **J Physiol,** v. 61, n. 2, p. 151-71, Apr 23 1926.

ADRIAN, E. D. A. B. **The Basis of Sensation. The Action of the Sense Organs**. New York ; London: Hafner Publishing Co., 1964.

AFRAZ, S. R.; KIANI, R.; ESTEKY, H. Microstimulation of inferotemporal cortex influences face categorization. **Nature,** v. 442, n. 7103, p. 692-5, Aug 10 2006.

AGGLETON, J. P. The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. **Trends Neurosci,** v. 16, n. 8, p. 328-33, Aug 1993.

AGGLETON, J. P.; MISHKIN, M. The amygdala: Sensory gateway to the emotions. In: PLUTCHIK, R. e KELLERMAN, H. (Ed.). **Emotion: Theory, Research, and Experience**. Orlando: FL, Academic, 1985. p.281-299.

AMARAL, D. G.; INSAUSTI, R. Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. **Exp Brain Res,** v. 88, n. 2, p. 375-88, 1992.

AMBROGGI, F. et al. Basolateral amygdala neurons facilitate reward-seeking behavior by exciting nucleus accumbens neurons. **Neuron,** v. 59, n. 4, p. 648-61, Aug 28 2008.

ARU, J. et al. Untangling cross-frequency coupling in neuroscience. **Curr Opin Neurobiol,** v. 31C, p. 51-61, Sep 8 2014.

AVERBECK, B. B.; LEE, D. Coding and transmission of information by neural ensembles. **Trends Neurosci,** v. 27, n. 4, p. 225-30, Apr 2004.

BARBAS, H. Anatomic basis of cognitive-emotional interactions in the primate prefrontal cortex. **Neurosci Biobehav Rev,** v. 19, n. 3, p. 499-510, Fall 1995.

BECHARA, A.; DAMASIO, H.; DAMASIO, A. R. Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. **Cereb Cortex,** v. 10, n. 3, p. 295-307, Mar 2000.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol,** v. 46, n. 6, p. 575-605, Aug 1995.

BENABID, A. L. et al. Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. **Lancet,** v. 337, n. 8738, p. 403-6, Feb 16 1991.

BLAIR, H. T. et al. The lateral amygdala processes the value of conditioned and unconditioned aversive stimuli. **Neuroscience,** v. 133, n. 2, p. 561-9, 2005..

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **J Comp Physiol Psychol,** v. 81, n. 2, p. 281-90, Nov 1972.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Crouching as an index of fear. **J Comp Physiol Psychol,** v. 67, n. 3, p. 370-5, Mar 1969a.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **J Comp Physiol Psychol,** v. 68, n. 1, p. 129-35, May 1969b.

BONDA, E. et al. Specific involvement of human parietal systems and the amygdala in the perception of biological motion. **J Neurosci,** v. 16, n. 11, p. 3737-44, Jun 1 1996.

BOSMAN, C. A.; LANSINK, C. S.; PENNARTZ, C. M. Functions of gamma-band synchronization in cognition: from single circuits to functional diversity across cortical and subcortical systems. **Eur J Neurosci,** v. 39, n. 11, p. 1982-99, Jun 2014.

BOSMAN, C. A. et al. Attentional stimulus selection through selective synchronization between monkey visual areas. **Neuron,** v. 75, n. 5, p. 875-88, Sep 6 2012.

BOUTON, M.; BOLLES, R. Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. **Animal Learning & Behavior,** v. 8, n. 3, p. 429-434, 1980/09/01 1980.

BROG, J. S. et al. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. **J Comp Neurol,** v. 338, n. 2, p. 255-78, Dec 8 1993.

BUCHEL, C.; DOLAN, R. J. Classical fear conditioning in functional neuroimaging. **Curr Opin Neurobiol,** v. 10, n. 2, p. 219-23, Apr 2000.

BUZSAKI, G.; ANASTASSIOU, C. A.; KOCH, C. The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes. **Nat Rev Neurosci,** v. 13, n. 6, p. 407-20, Jun 2012.

CADOR, M.; ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J. Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. **Neuroscience,** v. 30, n. 1, p. 77-86, 1989.

CAMPEAU, S.; DAVIS, M. Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. **J Neurosci,** v. 15, n. 3 Pt 2, p. 2312-27, Mar 1995.

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacol Biochem Behav,** v. 71, n. 3, p. 481-91, Mar 2002.

CHAPIN, J. K.; MOXON, K. A. **Neural prostheses for restoration of sensory and motor function**. Boca Raton ; London: CRC Press, 2000. 296 p.

CHRISTIE, M. J. et al. Excitatory amino acid projections to the nucleus accumbens septi in the rat: a retrograde transport study utilizing D[3H]aspartate and [3H]GABA. **Neuroscience,** v. 22, n. 2, p. 425-39, Aug 1987.

CLARK, K. L.; ARMSTRONG, K. M.; MOORE, T. Probing neural circuitry and function with electrical microstimulation. **Proc Biol Sci,** v. 278, n. 1709, p. 1121-30, Apr 22 2011.

COLPAERT, F. C.; WIEPKEMA, P. R. Brief communication ventromedial hypothalamus: fear conditioning and passive avoidance in rats. **Physiol Behav,** v. 16, n. 1, p. 91-5, Jan 1976.

COOPER, I. S. et al. Evoked metabolic responses in the limbic-striate system produced by stimulation of anterior thalamic nucleus in man. **Int J Neurol,** v. 18, p. 179-87, 1984.

COSTES, S. V. et al. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. **Biophys J,** v. 86, n. 6, p. 3993-4003, Jun 2004.

COTA, V. R. et al. Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylenetetrazole seizure outcome. **Epilepsy Behav,** v. 14 Suppl 1, p. 26-31, Jan 2009.

CURZON, P.; RUSTAY, N. R.; BROWMAN, K. E. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. 2009.

CUTRELL, E. B.; MARROCCO, R. T. Electrical microstimulation of primate posterior parietal cortex initiates orienting and alerting components of covert attention. **Exp Brain Res,** v. 144, n. 1, p. 103-13, May 2002.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annu Rev Neurosci,** v. 15, p. 353-75, 1992.

DAVIS, M.; WHALEN, P. J. The amygdala: vigilance and emotion. **Mol Psychiatry,** v. 6, n. 1, p. 13-34, Jan 2001.

DE OLIVEIRA, A. R. et al. Conditioned fear response is modulated by a combined action of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and dopamine activity in the basolateral amygdala. **Eur Neuropsychopharmacol,** v. 23, n. 5, p. 379-89, May 2013.

DEHAENE, S.; CHANGEUX, J. P. Experimental and theoretical approaches to conscious processing. **Neuron,** v. 70, n. 2, p. 200-27, Apr 28 2011.

DOBELLE, W. H.; MLADEJOVSKY, M. G.; GIRVIN, J. P. Artifical vision for the blind: electrical stimulation of visual cortex offers hope for a functional prosthesis. **Science,** v. 183, n. 4123, p. 440-4, Feb 1 1974.

DONG, H. W.; PETROVICH, G. D.; SWANSON, L. W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. **Brain Res Brain Res Rev,** v. 38, n. 1-2, p. 192-246, Dec 2001.

DRESP-LANGLEY, B.; DURUP, J. A plastic temporal brain code for conscious state generation. **Neural Plast,** v. 2009, p. 482696, 2009.

ECKHORN, R. et al. Coherent oscillations: a mechanism of feature linking in the visual cortex? Multiple electrode and correlation analyses in the cat. **Biol Cybern,** v. 60, n. 2, p. 121-30, 1988.

ENGEL, A. K.; FRIES, P.; SINGER, W. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. **Nat Rev Neurosci,** v. 2, n. 10, p. 704-16, Oct 2001.

ENGEL, A. K.; SINGER, W. Temporal binding and the neural correlates of sensory awareness. **Trends Cogn Sci,** v. 5, n. 1, p. 16-25, Jan 1 2001.

FALLON, J. B.; IRVINE, D. R.; SHEPHERD, R. K. Cochlear implants and brain plasticity. **Hear Res,** v. 238, n. 1-2, p. 110-7, Apr 2008.

FANSELOW, M. S. What is conditioned fear? **Trends Neurosci.,** v. 7, p. 460–462., 1984.

FANSELOW, M. S.; BOLLES, R. C. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. **J Comp Physiol Psychol,** v. 93, n. 4, p. 736-44, Aug 1979.

FELL, J.; AXMACHER, N. The role of phase synchronization in memory processes. **Nat Rev Neurosci,** v. 12, n. 2, p. 105-18, Feb 2011.

FREEMAN, W. J. The physiology of perception. **Sci Am,** v. 264, n. 2, p. 78-85, Feb 1991.

FRIES, P. A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. **Trends Cogn Sci,** v. 9, n. 10, p. 474-80, Oct 2005.

FRIES, P. et al. Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. **Science,** v. 291, n. 5508, p. 1560-3, Feb 23 2001.

FRIES, P. et al. Oscillatory neuronal synchronization in primary visual cortex as a correlate of stimulus selection. **J Neurosci,** v. 22, n. 9, p. 3739-54, May 1 2002..

FRITSCH, G.; HITZIG, E. Uber die elektrische Erregbarkeit des Grosshims. **Arch. Anat. Physiol. wiss Med.,** v. 37, p. 300–332, 1870

GALLAGHER, M.; HOLLAND, P. C. The amygdala complex: multiple roles in associative learning and attention. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 91, n. 25, p. 11771-6, Dec 6 1994.

GARCIA-LARREA, L. et al. Electrical stimulation of motor cortex for pain control: a combined PET-scan and electrophysiological study. **Pain,** v. 83, n. 2, p. 259-73, Nov 1999.

GAURIAU, C.; BERNARD, J. F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. **Exp Physiol,** v. 87, n. 2, p. 251-8, Mar 2002.

GEORGOPOULOS, A. P.; SCHWARTZ, A. B.; KETTNER, R. E. Neuronal population coding of movement direction. **Science,** v. 233, n. 4771, p. 1416-9, Sep 26 1986.

GOLUBITSKY, M. et al. Symmetry in locomotor central pattern generators and animal gaits. **Nature,** v. 401, n. 6754, p. 693-5, Oct 14 1999.

GRAY, C. M. et al. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. **Nature,** v. 338, n. 6213, p. 334-7, Mar 23 1989.

GREENSTEIN, Y. J.; PAVLIDES, C.; WINSON, J. Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity. **Brain Res,** v. 438, n. 1-2, p. 331-4, Jan 12 1988.

GRINVALD, A. et al. Neuronal assemblies: single cortical neurons are obedient members of a huge orchestra. **Biopolymers,** v. 68, n. 3, p. 422-36, Mar 2003.

GROSS, C. G. Genealogy of the "grandmother cell". **Neuroscientist,** v. 8, n. 5, p. 512-8, Oct 2002.

GROSSBERG, S. How does a brain build a cognitive code? **Psychol Rev,** v. 87, n. 1, p. 1-51, Jan 1980.

GROSSBERG, S. The link between brain learning, attention, and consciousness. **Conscious Cogn,** v. 8, n. 1, p. 1-44, Mar 1999.

GUERTIN, P. A.; STEUER, I. Key central pattern generators of the spinal cord. **J Neurosci Res,** v. 87, n. 11, p. 2399-405, Aug 15 2009.

HALL, J.; THOMAS, K. L.; EVERITT, B. J. Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. **Eur J Neurosci,** v. 13, n. 7, p. 1453-8, Apr 2001.

HAMANN, S. Cognitive and neural mechanisms of emotional memory. **Trends Cogn Sci,** v. 5, n. 9, p. 394-400, Sep 1 2001.

HATA, T.; OKAICHI, H. Medial prefrontal cortex and precision of temporal discrimination: a lesion, microinjection, and microdialysis study. **Neurosci Res,** v. 49, n. 1, p. 81-9, May 2004.

HEYNEN, A. J.; BEAR, M. F. Long-term potentiation of thalamocortical transmission in the adult visual cortex in vivo. **J Neurosci,** v. 21, n. 24, p. 9801-13, Dec 15 2001.

HODGKIN, A. Edgar Douglas Adrian, Baron Adrian of Cambridge. 30 November 1889-4 August 1977. **Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society,** v. 25, p. 1-73, November 1, 1979 1979.

HOLAHAN, M. R.; WHITE, N. M. Amygdala c-Fos induction corresponds to unconditioned and conditioned aversive stimuli but not to freezing. **Behav Brain Res,** v. 152, n. 1, p. 109-20, Jun 4 2004.

HOOPER, S. L. Central Pattern Generators. In: (Ed.). **eLS**: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.

HYMAN, J. M. et al. Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough. **J Neurosci,** v. 23, n. 37, p. 11725-31, Dec 17 2003.

IKEGAYA, Y. et al. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. **Science,** v. 304, n. 5670, p. 559-64, Apr 23 2004..

KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. **Neurosci Biobehav Rev,** v. 30, n. 2, p. 188-202, 2006.

KIMMEL, D. L.; MOORE, T. Temporal patterning of saccadic eye movement signals. **J Neurosci,** v. 27, n. 29, p. 7619-30, Jul 18 2007.

KNAPSKA, E.; MAREN, S. Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. **Learn Mem,** v. 16, n. 8, p. 486-93, Aug 2009.

KNAPSKA, E. et al. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. **Physiol Rev,** v. 87, n. 4, p. 1113-73, Oct 2007.

KONORSKI, J. **Integrative activity of the brain : an interdisciplinary approach**. Chicago ; London: University of Chicago Press, 1967.

KORALEK, A. C. et al. Corticostriatal plasticity is necessary for learning intentional neuroprosthetic skills. **Nature,** v. 483, n. 7389, p. 331-5, Mar 15 2012.

KOYAMA, S. On the relation between encoding and decoding of neuronal spikes. **Neural Comput,** v. 24, n. 6, p. 1408-25, Jun 2012.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. **J Comp Neurol,** v. 178, n. 2, p. 255-80, Mar 15 1978.

KWON, J. T.; CHOI, J. S. Cornering the fear engram: long-term synaptic changes in the lateral nucleus of the amygdala after fear conditioning. **J Neurosci,** v. 29, n. 31, p. 9700-3, Aug 5 2009.

LARSON, C. L. et al. Fear is fast in phobic individuals: amygdala activation in response to fear-relevant stimuli. **Biol Psychiatry,** v. 60, n. 4, p. 410-7, Aug 15 2006..

LAURENT, G.; WEHR, M.; DAVIDOWITZ, H. Temporal representations of odors in an olfactory network. **J Neurosci,** v. 16, n. 12, p. 3837-47, Jun 15 1996.

LEDOUX, J. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cell Mol Neurobiol,** v. 23, n. 4-5, p. 727-38, Oct 2003.

LEDOUX, J. The amygdala. **Curr Biol,** v. 17, n. 20, p. R868-74, Oct 23 2007.

LEDOUX, J. E. Emotion: clues from the brain. **Annu Rev Psychol,** v. 46, p. 209-35, 1995.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci,** v. 23, p. 155-84, 2000.

LEDOUX, J. E. et al. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. **J Neurosci,** v. 10, n. 4, p. 1062-9, Apr 1990.

LEDOUX, J. E.; FARB, C.; RUGGIERO, D. A. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. **J Neurosci,** v. 10, n. 4, p. 1043-54, Apr 1990.

LEDOUX, J. E. et al. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **J Neurosci,** v. 8, n. 7, p. 2517-29, Jul 1988.

LEE, Y. K.; CHOI, J. S. Inactivation of the medial prefrontal cortex interferes with the expression but not the acquisition of differential fear conditioning in rats. **Exp Neurobiol,** v. 21, n. 1, p. 23-9, Mar 2012.

LEOPOLD, D. A.; BONDAR, I. V.; GIESE, M. A. Norm-based face encoding by single neurons in the monkey inferotemporal cortex. **Nature,** v. 442, n. 7102, p. 572-5, Aug 3 2006.

LIKHTIK, E. et al. Prefrontal control of the amygdala. **J Neurosci,** v. 25, n. 32, p. 7429-37, Aug 10 2005.

LIKHTIK, E. et al. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. **Nat Neurosci,** v. 17, n. 1, p. 106-13, Jan 2014.

LIMOUSIN, P. et al. Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. **N Engl J Med,** v. 339, n. 16, p. 1105-11, Oct 15 1998.

LLINAS, R. R. **I of the vortex : from neurons to self**. Cambridge, Mass. ; London: MIT Press, 2001. x, 302 p.

LORENTE DE NO, R. Analysis of the activity of the chains of internuncial neurons. **J. Neurophysiol.,** v. 1, n. 3, p. 207-244, 1938.

LUND, J. P. Mastication and its control by the brain stem. **Crit Rev Oral Biol Med,** v. 2, n. 1, p. 33-64, 1991.

MALDONADO, P. et al. Synchronization of neuronal responses in primary visual cortex of monkeys viewing natural images. **J Neurophysiol,** v. 100, n. 3, p. 1523-32, Sep 2008.

MALDONADO, P. E.; GERSTEIN, G. L. Reorganization in the auditory cortex of the rat induced by intracortical microstimulation: a multiple single-unit study. **Exp Brain Res,** v. 112, n. 3, p. 420-30, Dec 1996.

MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Long-term potentiation--a decade of progress? **Science,** v. 285, n. 5435, p. 1870-4, Sep 17 1999.

MANZUR, H. E. et al. Synchronization across sensory cortical areas by electrical microstimulation is sufficient for behavioral discrimination. **Cereb Cortex,** v. 23, n. 12, p. 2976-86, Dec 2013.

MAREK, R. et al. The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. **J Physiol,** v. 591, n. Pt 10, p. 2381-91, May 15 2013.

MASCAGNI, F.; MCDONALD, A. J.; COLEMAN, J. R. Corticoamygdaloid and corticocortical projections of the rat temporal cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. **Neuroscience,** v. 57, n. 3, p. 697-715, Dec 1993..

MASUDA, N.; AIHARA, K. Dual coding hypotheses for neural information representation. **Math Biosci,** v. 207, n. 2, p. 312-21, Jun 2007.

MATSUMOTO, N. et al. Population dynamics of face-responsive neurons in the inferior temporal cortex. **Cereb Cortex,** v. 15, n. 8, p. 1103-12, Aug 2005.

MCCULLOCH, W.; PITTS, W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. **The bulletin of mathematical biophysics,** v. 5, n. 4, p. 115-133, 1943/12/01 1943.

MCDONALD, A. J. Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. **Neuroscience,** v. 44, n. 1, p. 15-33, 1991.

MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Prog Neurobiol,** v. 55, n. 3, p. 257-332, Jun 1998.

MCDONALD, A. J.; MASCAGNI, F.; GUO, L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. **Neuroscience,** v. 71, n. 1, p. 55-75, Mar 1996.

MCGAUGH, J. L. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends Neurosci,** v. 25, n. 9, p. 456, Sep 2002.

MCLAUGHLIN, R. J.; FLORESCO, S. B. The role of different subregions of the basolateral amygdala in cue-induced reinstatement and extinction of food-seeking behavior. **Neuroscience,** v. 146, n. 4, p. 1484-94, Jun 8 2007.

MEDEIROS, D. C. et al. Anatomically dependent anticonvulsant properties of temporally-coded electrical stimulation. **Epilepsy Behav,** v. 23, n. 3, p. 294-7, Mar 2012.

MEDEIROS, D. C. et al. Temporal rearrangement of pre-ictal PTZ induced spike discharges by low frequency electrical stimulation to the amygdaloid complex. **Brain Stimul,** v. 7, n. 2, p. 170-8, Mar-Apr 2014.

MERZENICH, M. M.; SCHINDLER, D. N.; WHITE, M. W. Feasibility of multichannel scala tympani stimulation. **Laryngoscope,** v. 84, n. 11, p. 1887-93, Nov 1974..

MESQUITA, M. B. et al. Distinct temporal patterns of electrical stimulation influence neural recruitment during PTZ infusion: an fMRI study. **Prog Biophys Mol Biol,** v. 105, n. 1-2, p. 109-18, Mar 2011.

MESULAM, M. M. From sensation to cognition. **Brain,** v. 121 (Pt 6), p. 1013-52, Jun 1998.

MILAD, M. R.; VIDAL-GONZALEZ, I.; QUIRK, G. J. Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. **Behav Neurosci,** v. 118, n. 2, p. 389-94, Apr 2004.

MILLER, A. D.; CURRAN, T.; VERMA, I. M. c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. **Cell,** v. 36, n. 1, p. 51-60, Jan 1984.

MOELLER, S.; FREIWALD, W. A.; TSAO, D. Y. Patches with links: a unified system for processing faces in the macaque temporal lobe. **Science,** v. 320, n. 5881, p. 1355-9, Jun 6 2008.

MOGA, M. M. et al. Organization of cortical, basal forebrain, and hypothalamic afferents to the parabrachial nucleus in the rat. **J Comp Neurol,** v. 295, n. 4, p. 624-61, May 22 1990.

MOHAMMAD-ZADEH, M. et al. Effect of low frequency stimulation of perforant path on kindling rate and synaptic transmission in the dentate gyrus during kindling acquisition in rats. **Epilepsy Res,** v. 75, n. 2-3, p. 154-61, Jul 2007.

MORGAN, M. A.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. **Behav Neurosci,** v. 109, n. 4, p. 681-8, Aug 1995.

MORGAN, M. A.; SCHULKIN, J.; LEDOUX, J. E. Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: the memory for prior extinction training. **Behav Brain Res,** v. 146, n. 1-2, p. 121-30, Nov 30 2003.

MORRIS, J. S.; OHMAN, A.; DOLAN, R. J. Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. **Nature,** v. 393, n. 6684, p. 467-70, Jun 4 1998.

MOSCARELLO, J. M.; LEDOUX, J. E. Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. **J Neurosci,** v. 33, n. 9, p. 3815-23, Feb 27 2013.

MOUNTCASTLE, V. B. **The view from within: pathways to the study of perception**. 1975.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development,** v. 116, n. 1, p. 201-11, Sep 1992.

NICOLELIS, M. A. Actions from thoughts. **Nature,** v. 409, n. 6818, p. 403-7, Jan 18 2001.

NORMANN, R. A. et al. High-resolution spatio-temporal mapping of visual pathways using multi-electrode arrays. **Vision Res,** v. 41, n. 10-11, p. 1261-75, 2001.

O'DOHERTY, J. E. et al. A brain-machine interface instructed by direct intracortical microstimulation. **Front Integr Neurosci,** v. 3, p. 20, 2009.

O'DOHERTY, J. E. et al. Active tactile exploration using a brain-machine-brain interface. **Nature,** v. 479, n. 7372, p. 228-31, Nov 10 2011.

OLDS, J.; MILNER, P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. **J Comp Physiol Psychol,** v. 47, n. 6, p. 419-27, Dec 1954.

OTTERSEN, O. P. et al. Putative amino acid transmitters in the amygdala. **Adv Exp Med Biol,** v. 203, p. 53-66, 1986.

OTTO, K. J.; ROUSCHE, P. J.; KIPKE, D. R. Cortical microstimulation in auditory cortex of rat elicits best-frequency dependent behaviors. **J Neural Eng,** v. 2, n. 2, p. 42-51, Jun 2005.

PARE, D.; COLLINS, D. R.; PELLETIER, J. G. Amygdala oscillations and the consolidation of emotional memories. **Trends Cogn Sci,** v. 6, n. 7, p. 306-314, Jul 1 2002.

PAVLIDES, C. et al. Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of theta-rhythm. **Brain Res,** v. 439, n. 1-2, p. 383-7, Jan 26 1988.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6th. Amsterdam ; Oxford: Elsevier Academic, 2007. xxxi, ca. [420] p.

PENFIELD, W.; RASMUSSEN, T. **The cerebral cortex of man : a clinical study of localization of function**. New York: Macmillan, 1950. xv, 248 p.

PERRETT, D. I. et al. Organization and functions of cells responsive to faces in the temporal cortex. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,** v. 335, n. 1273, p. 23-30, Jan 29 1992.

PERRETT, D. I.; ROLLS, E. T.; CAAN, W. Visual neurones responsive to faces in the monkey temporal cortex. **Exp Brain Res,** v. 47, n. 3, p. 329-42, 1982.

PETROVICH, G. D.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. **Brain Res Brain Res Rev,** v. 38, n. 1-2, p. 247-89, Dec 2001.

PEZZONE, M. A. et al. Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. **Brain Res,** v. 597, n. 1, p. 41-50, Nov 27 1992.

PITKANEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J. E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends Neurosci,** v. 20, n. 11, p. 517-23, Nov 1997..

PRICE, J. L.; RUSSCHEN, F. T.; AMARAL, D. G. The limbic region II: The amygdaloid complex. In: BJORKLUND, A.;HOKFELT, T.*, et al* (Ed.). **Handbook of chemical Neuroanatomy**. Amsterdam: Elsevier Science, v.5, 1987. p.279-388.

QUINKERT, A. W.; SCHIFF, N. D.; PFAFF, D. W. Temporal patterning of pulses during deep brain stimulation affects central nervous system arousal. **Behav Brain Res,** v. 214, n. 2, p. 377-85, Dec 25 2010.

QUIRK, G. J.; GARCIA, R.; GONZALEZ-LIMA, F. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. **Biol Psychiatry,** v. 60, n. 4, p. 337-43, Aug 15 2006.

QUIRK, G. J. et al. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. **J Neurosci,** v. 23, n. 25, p. 8800-7, Sep 24 2003.

QUIROGA, R. Q. et al. Invariant visual representation by single neurons in the human brain. **Nature,** v. 435, n. 7045, p. 1102-7, Jun 23 2005.

RANCK, J. B., JR. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. **Brain Res,** v. 98, n. 3, p. 417-40, Nov 21 1975.

RESCORLA, R. A. Probability of shock in the presence and absence of CS in fear conditioning. **J Comp Physiol Psychol,** v. 66, n. 1, p. 1-5, Aug 1968.

REY, H. G.; FRIED, I.; QUIAN QUIROGA, R. Timing of single-neuron and local field potential responses in the human medial temporal lobe. **Curr Biol,** v. 24, n. 3, p. 299-304, Feb 3 2014.

RIZVI, T. A. et al. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: Topography and reciprocity. **The Journal of Comparative Neurology,** v. 303, n. 1, p. 121-131, 1991.

ROGAN, M. T.; LEDOUX, J. E. Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. **Cell,** v. 85, n. 4, p. 469-75, May 17 1996.

ROGAN, M. T.; STAUBLI, U. V.; LEDOUX, J. E. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. **Nature,** v. 390, n. 6660, p. 604-7, Dec 11 1997.

ROLLS, E. T.; TREVES, A. The neuronal encoding of information in the brain. **Prog Neurobiol,** v. 95, n. 3, p. 448-90, Nov 2011.

ROMANSKI, L. M. et al. Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. **Behav Neurosci,** v. 107, n. 3, p. 444-50, Jun 1993.

ROMO, R. et al. Sensing without touching: psychophysical performance based on cortical microstimulation. **Neuron,** v. 26, n. 1, p. 273-8, Apr 2000.

RUMELHART, D. E.; MCCLELLAND, J. L. **Parallel distributed processing : explorations in the microstructure of cognition**. Cambridge, Mass.: MIT Press, 1986.

RUSSELL, W. C.; NEWMAN, C.; WILLIAMSON, D. H. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. **Nature,** v. 253, n. 5491, p. 461-2, Feb 6 1975.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev,** v. 83, n. 3, p. 803-34, Jul 2003.

SALZMAN, C. D.; BRITTEN, K. H.; NEWSOME, W. T. Cortical microstimulation influences perceptual judgements of motion direction. **Nature,** v. 346, n. 6280, p. 174-7, Jul 12 1990.

SANDER, D.; GRAFMAN, J.; ZALLA, T. The human amygdala: an evolved system for relevance detection. **Rev Neurosci,** v. 14, n. 4, p. 303-16, 2003.

SCHWINDT, P.; O'BRIEN, J. A.; CRILL, W. Quantitative analysis of firing properties of pyramidal neurons from layer 5 of rat sensorimotor cortex. **J Neurophysiol,** v. 77, n. 5, p. 2484-98, May 1997.

SEIDENBECHER, T. et al. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. **Science,** v. 301, n. 5634, p. 846-50, Aug 8 2003..

SHIFLETT, M. W.; BALLEINE, B. W. At the limbic-motor interface: disconnection of basolateral amygdala from nucleus accumbens core and shell reveals dissociable components of incentive motivation. **Eur J Neurosci,** v. 32, n. 10, p. 1735-43, Nov 2010.

SIMON, V. M. Emotional participation in decision-making. **Psychology in Spain,** v. 12, n. 1, p. 100-107, 1988.

SINGER, W. Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. **Annu Rev Physiol,** v. 55, p. 349-74, 1993.

SINGER, W. Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? **Neuron,** v. 24, n. 1, p. 49-65, 111-25, Sep 1999a.

SINGER, W. Time as coding space? **Curr Opin Neurobiol,** v. 9, n. 2, p. 189-94, Apr 1999b.

SINGER, W. Distributed processing and temporal codes in neuronal networks. **Cogn Neurodyn,** v. 3, n. 3, p. 189-96, Sep 2009.

SKINNER, B. F. **The behavior of organisms: an experimental analysis**. New York, London,: D. Appleton-Century Company, 1938. ix, 457 p.

SKINNER, B. F. Operant behavior. In: HONIG, W. K. E. (Ed.). **Operant behavior Areas of Research and Application**. New York: Appleton-Century-Crofts, 1966. p.12-32.

SMITH, M. A. et al. Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. **Brain Res,** v. 578, n. 1-2, p. 135-41, Apr 24 1992.

SO, R. Q. et al. Irregular High Frequency Patterns Decrease the Effectiveness of Deep Brain Stimulation in a Rat Model of Parkinson's Disease. Proceedings of the 5th International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering 2011, Cancun, Mexico,. April 27 - May 1. p.322-325.

SONG, C. K. et al. Wholebrain Cerebral Hemodynamics during Unilateral Direct Electrical Stimulation in the Somatosensory Cortex of Epileptic Mouse Brains. **Journal of the Korean Physical Society,** v. 55, n. 4, p. 1666-1672, 2009.

SONG, W. et al. Cortical plasticity induced by spike-triggered microstimulation in primate somatosensory cortex. **PLoS One,** v. 8, n. 3, p. e57453, 2013.

STEIN, P. S. Central pattern generators and interphyletic awareness. **Prog Brain Res,** v. 123, p. 259-71, 1999.

STEIN, R. B.; GOSSEN, E. R.; JONES, K. E. Neuronal variability: noise or part of the signal? **Nat Rev Neurosci,** v. 6, n. 5, p. 389-97, May 2005.

STUBER, G. D. et al. Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. **Nature,** v. 475, n. 7356, p. 377-80, Jul 21 2011.

TALWAR, S. K. et al. Rat navigation guided by remote control. **Nature,** v. 417, n. 6884, p. 37-8, May 2 2002.

TEHOVNIK, E. J. Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses. **J Neurosci Methods,** v. 65, n. 1, p. 1-17, Mar 1996.

THOMSON, E. E.; CARRA, R.; NICOLELIS, M. A. Perceiving invisible light through a somatosensory cortical prosthesis. **Nat Commun,** v. 4, p. 1482, 2013.

TORT, A. B. et al. Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. **J Neurophysiol,** v. 104, n. 2, p. 1195-210, Aug 2010.

TSUBOKAWA, T. et al. Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. **Acta Neurochir Suppl (Wien),** v. 52, p. 137-9, 1991.

TSUBOKAWA, T. et al. Chronic motor cortex stimulation in patients with thalamic pain. **J Neurosurg,** v. 78, n. 3, p. 393-401, Mar 1993.

TYE, K. M. et al. Rapid strengthening of thalamo-amygdala synapses mediates cue-reward learning. **Nature,** v. 453, n. 7199, p. 1253-7, Jun 26 2008.

UPTON, A. R. et al. Evoked metabolic responses in the limbic-striate system produced by stimulation of anterior thalamic nucleus in man. **Pacing Clin Electrophysiol,** v. 10, n. 1 Pt 2, p. 217-25, Jan 1987.

UYLINGS, H. B. M.; GROENEWEGEN, H. J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? **Behavioural Brain Research,** v. 146, n. 1–2, p. 3-17, 11/30/ 2003.

VAN DER KOOY, D. et al. The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. **J Comp Neurol,** v. 224, n. 1, p. 1-24, Mar 20 1984.

VARELA, F. et al. The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. **Nat Rev Neurosci,** v. 2, n. 4, p. 229-39, Apr 2001.

VEENING, J. G.; SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: a combined retrograde transport-immunohistochemical study. **Brain Res,** v. 303, n. 2, p. 337-57, Jun 15 1984.

VENKATRAMAN, S.; CARMENA, J. M. Active sensing of target location encoded by cortical microstimulation. **IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng,** v. 19, n. 3, p. 317-24, Jun 2011.

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse,** v. 51, n. 1, p. 32-58, Jan 2004.

VIANNA, D. M. et al. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. **Brain Res Bull,** v. 62, n. 3, p. 179-89, Dec 30 2003.

VIDAL-GONZALEZ, I. et al. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learn Mem,** v. 13, n. 6, p. 728-33, Nov-Dec 2006.

VUILLEUMIER, P. et al. Effects of attention and emotion on face processing in the human brain: an event-related fMRI study. **Neuron,** v. 30, n. 3, p. 829-41, Jun 2001.

VUILLEUMIER, P. et al. Distinct spatial frequency sensitivities for processing faces and emotional expressions. **Nat Neurosci,** v. 6, n. 6, p. 624-31, Jun 2003.

WARREN, D. J.; FERNANDEZ, E.; NORMANN, R. A. High-resolution two-dimensional spatial mapping of cat striate cortex using a 100-microelectrode array. **Neuroscience,** v. 105, n. 1, p. 19-31, 2001.

WATSON, J. B.; RAYNER, R. Conditioned emotional reactions. **J. Exp. Psychol.,** v. 3, p. 1920, 1920.

WHALEN, P. J.; PHELPS, E. A. **The human amygdala**. New York ; London: Guilford Press, 2009.

WORLEY, P. F. et al. Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. **J Neurosci,** v. 13, n. 11, p. 4776-86, Nov 1993.

ZELINSKI, E. L. et al. Prefrontal cortical contributions during discriminative fear conditioning, extinction, and spontaneous recovery in rats. **Exp Brain Res,** v. 203, n. 2, p. 285-97, Jun 2010.

APENDICE

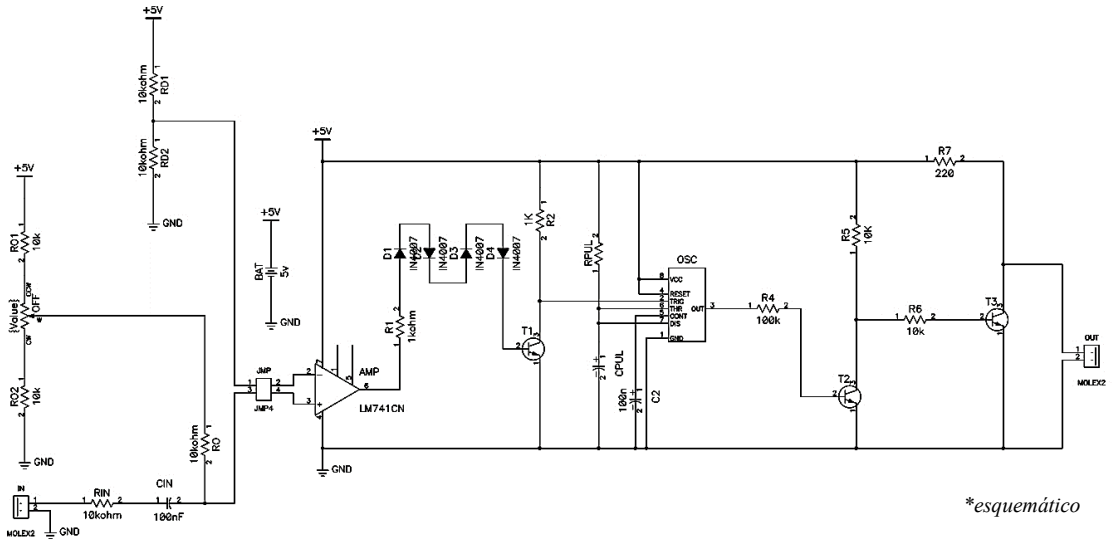
1. *SETUP* DE MICROESTIMULAÇÃO

Desenvolvemos um sistema eletrônico capaz de temporizar diferentes padrões de microestimulação elétrica. Basicamente, os intervalos inter-pulso são desenhados em softwares de produção e gravação de áudio. Neste sentido, trilhas no formato **.wav*, quando tocadas, são direcionadas da saída de áudio de um computador, ou de um dispositivo móvel como um *mp3 player*, para um circuito de "*trigger*". Este circuito, a partir da diferença de potencial gerado pela saída de áudio, é capaz de gerar sinais quadráticos, com tensão fixa de 5 V e comprimentos de onda variáveis. Os sinais quadráticos de "*trigger*" são direcionados a um gerador comercial de corrente elétrica (DIGITIMER Ltd – *Isolated Stimulator Model DS3 with Constant Current output*), Este gerador forma pulsos quadráticos, monofásicos, positivos, com amplitude e comprimento de onda programáveis.

1.1 TRIGGER

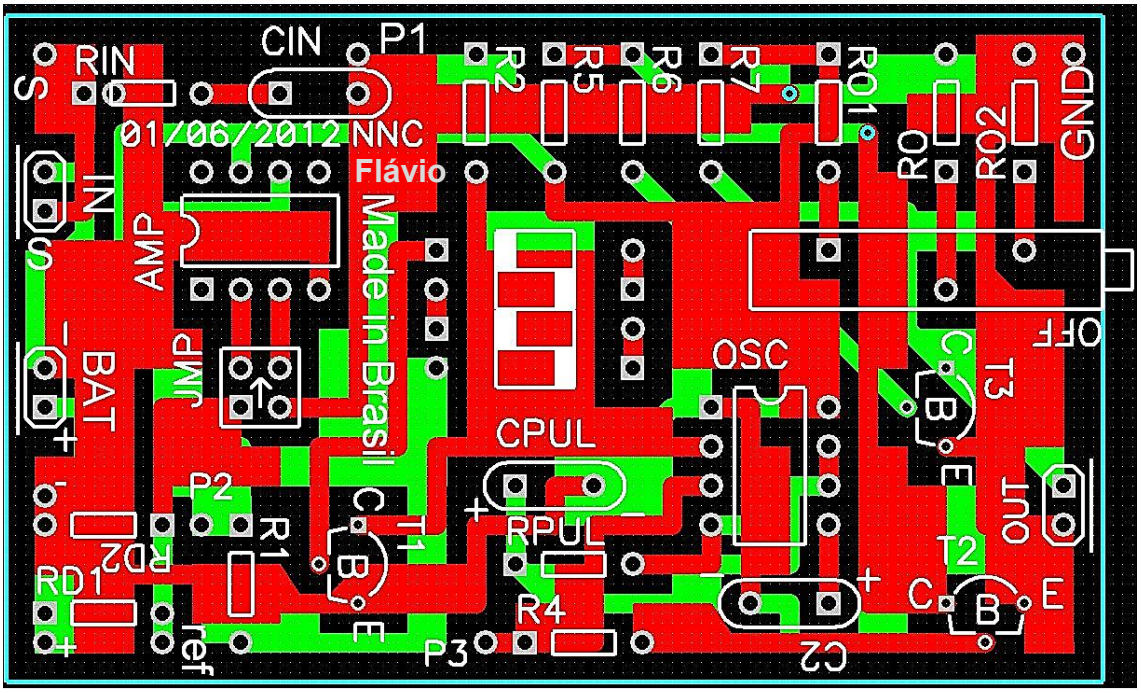
(Desenvolvido pelo Prof. Márcio Moraes e Flávio Mourão)

Circuito idealizado para gerar sinais quadráticos, com tensão fixa de 5v e comprimentos de onda variáveis de acordo com os valores associados entre resistor (RPUL) e capacitor (CPUL), nos pinos 6 (*threshold)* e 7 (*discharging)* do oscilador (LM555), respectivamente. Basicamente o sinal quadrático nasce a partir da diferença de potencial gerada por diferentes fontes de áudio comerciais, como placas de som de computadores ou de dispositivos móveis, como players portáteis. Isso é possível devido ao ganho garantido pelo amplificador operacional (LM741), posiciado na entrada do sinal e pela regulagem do *offset* pelo potenciômetro [entrada, pino 2(-) ou 3(+)]. A comparação do sinal de áudio junto ao *threshold* pode ser gatilhada por um pico positivo ou negativo, de acordo com a configuração do jumper posicionado na entrada do amplificador.

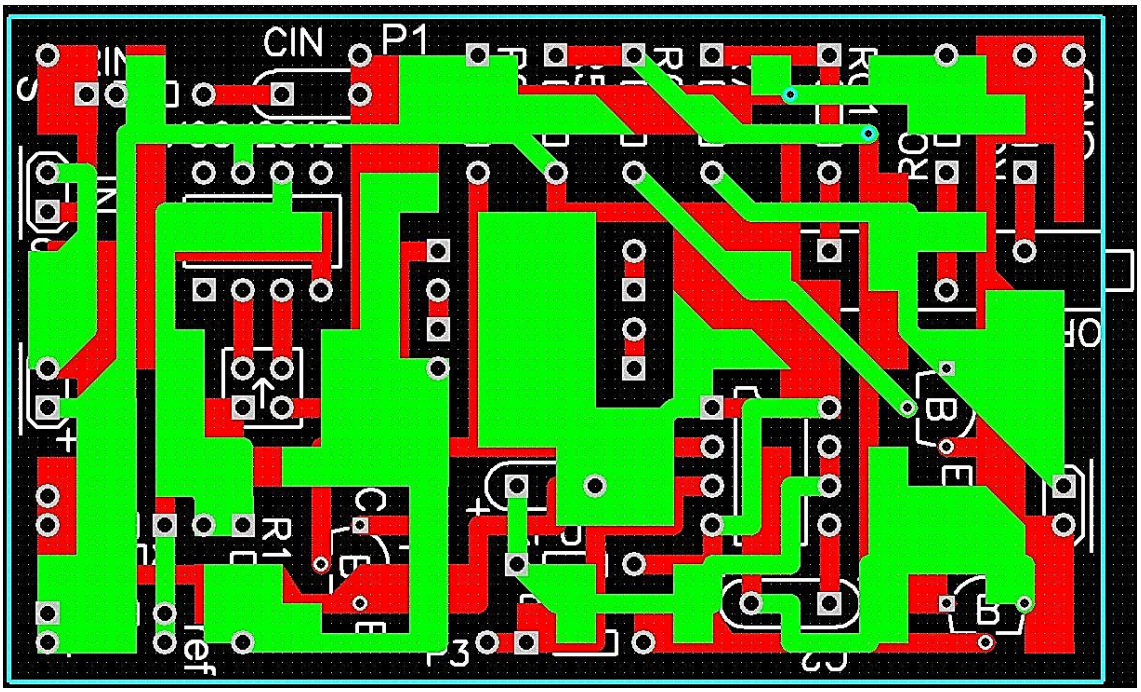


[1] Exemplo: Rpul – 10 kOhm e Cpul – 100 nF ----> Rpul x Cpul (10000 x 0,0000001) = 0,001 s ---> **1 ms**

PCB



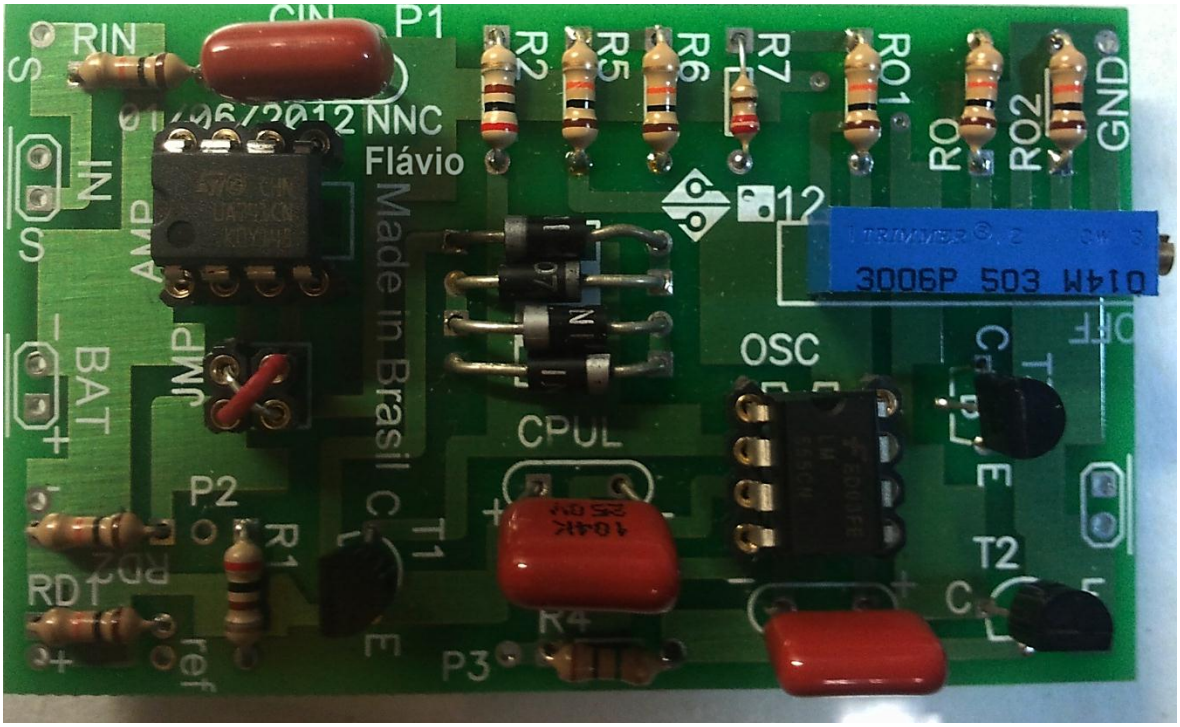
**Top*



**Bottom*

Saídas Secundárias e Pontas de prova (P):
+, – , GND: *Saídas para acoplamento de outras placas /* ***S:*** *Sinal de áudio /* ***REF:*** *Divisor de tensão /* ***P1:*** *regulagem do offset /* ***P2:*** *saída do amplificador /* ***P3:*** *Saída do oscilador*

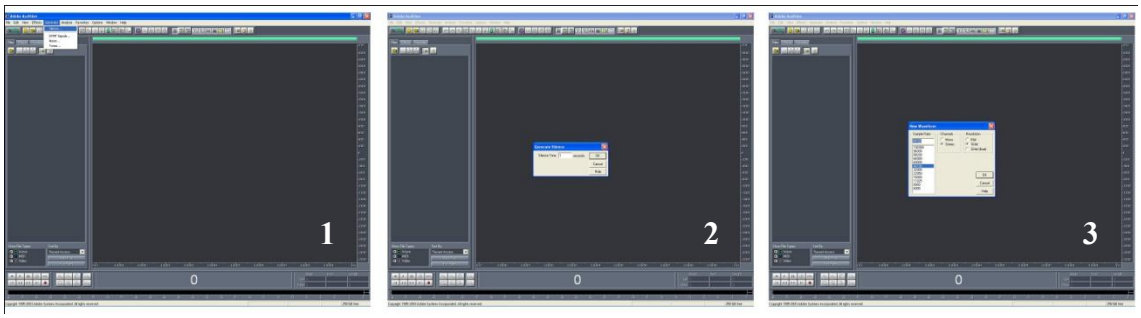
Placa Montada



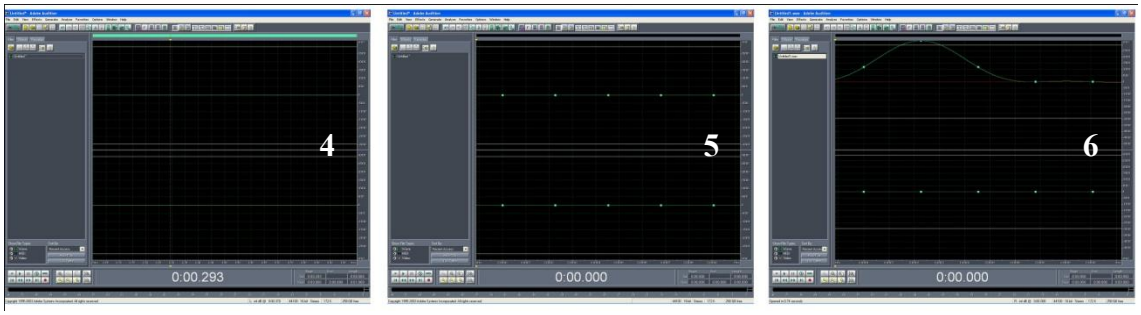
1.1.1 CONFIGURAÇÃO DO SINAL DE ÁUDIO

A temporalização dos sinais de *trigger* pode ser facilmente determinada pelos sinais de áudio, em programas como *Adobe Audition*. A partir de uma única trilha de áudio estéreo (2 sinais positivos e 2 negativos), quatro sinais de *trigger* diferentes podem ser gerados, obviamente associados a 4 circuitos acoplados. Neste contexto, chama-se a atenção para o *jumper* colocado na entrada do amplificador operacional. Para sinais de áudio positivos, os curtos no *jumper* devem obedecer à seguinte pinagem: **1 → 2** (entrada Pino 2 LM741 - NEGATIVO); **3 → 4** (entrada Pino 3 LM741- POSITIVO), e para sinais de áudio negativos: **1 → 4**; **3 → 2**.

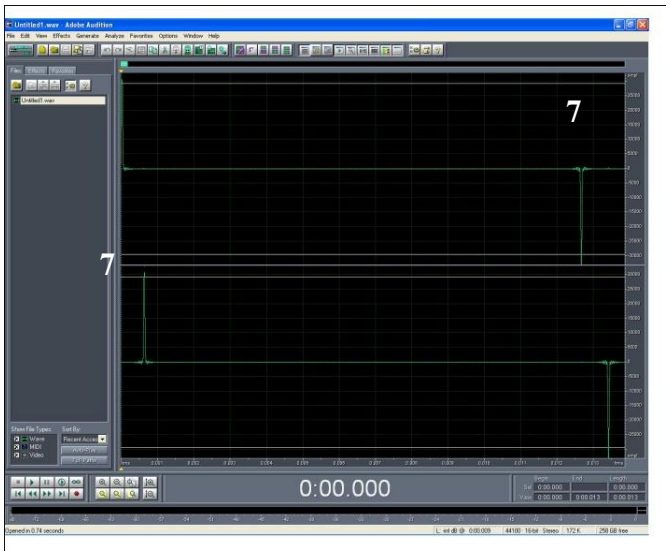
1 e 2 – Gerar silêncio (tamanho da trilha)
3 – Configurar sinal *Estéreo* com resolução de 16-bit e *Sample Rate* de 44100



4 – Sinal de silencio criado
5 – Dar um *Zoom* máximo na trilha.
6 – Um a quatro *Samples* devem ser configurados, elevando ou diminuindo ao máximo. Os *Samples* laterais devem ser ajustados para evitar grandes oscilações, que porventura podem servir como sinal quadrático de trigger (também regulado pelo *offset*).



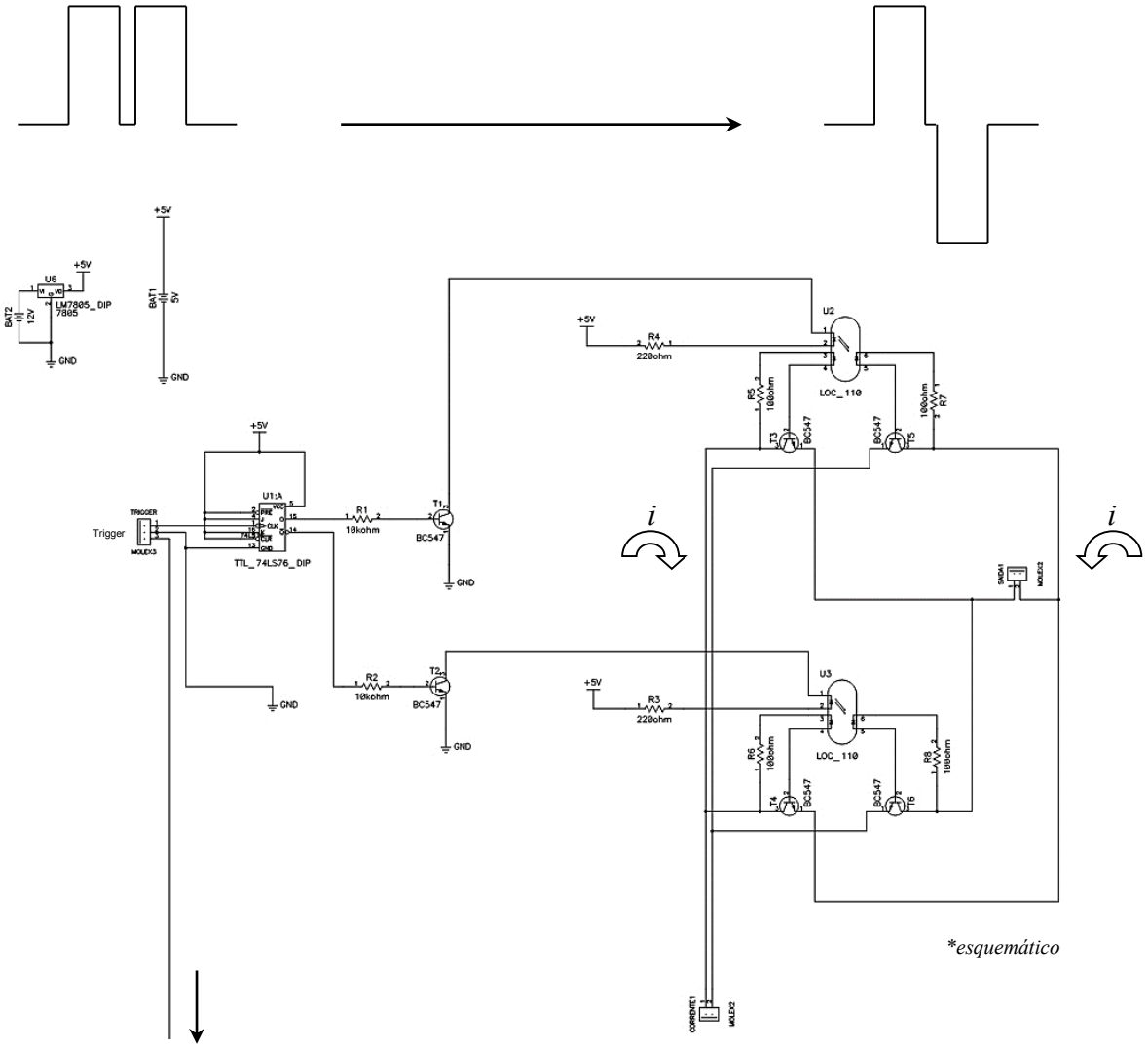
7 – No caso da necessidade de mais de um sinal de *trigger,* a disposição temporal dos *Samples* na trilha deve ser configurada de acordo com o experimento.



1.2 INVERSOR DE PULSO

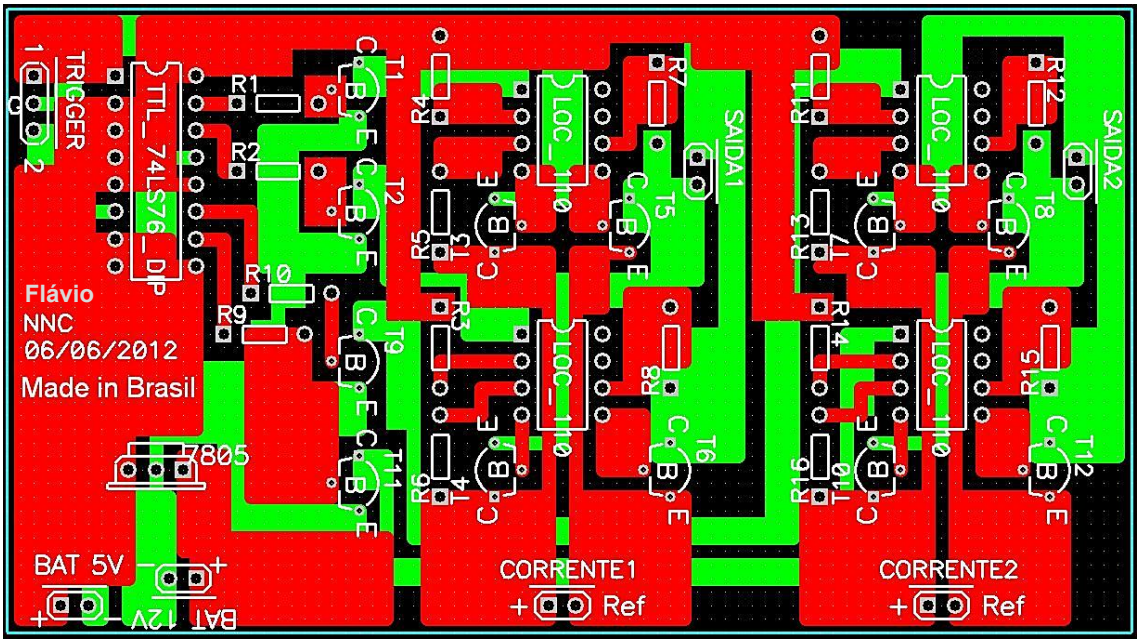
(Desenvolvido pelo Prof. Márcio Moraes e Flávio Mourão)

Circuito idealizado para que a cada dois pulsos elétricos, advindos de um gerador de corrente, um deles seja invertido. Transistores (NPN, modelo BC547), ligados a desacopladores ópticos (modelo LOC_110), foram utilizados como *Switch*. Cada pulso de trigger (o mesmo que aciona o gerador de corrente) aciona, de forma alternada portas Q e $\overline{Q}$ de um TTL74LS76 (Flip-Flop). Assim, de forma geral, o TTL é o responsável por decidir a polaridade da tensão gerada, acionando o circuito cuja corrente de saída é positiva ou o circuito cuja corrente de saída é negativa.

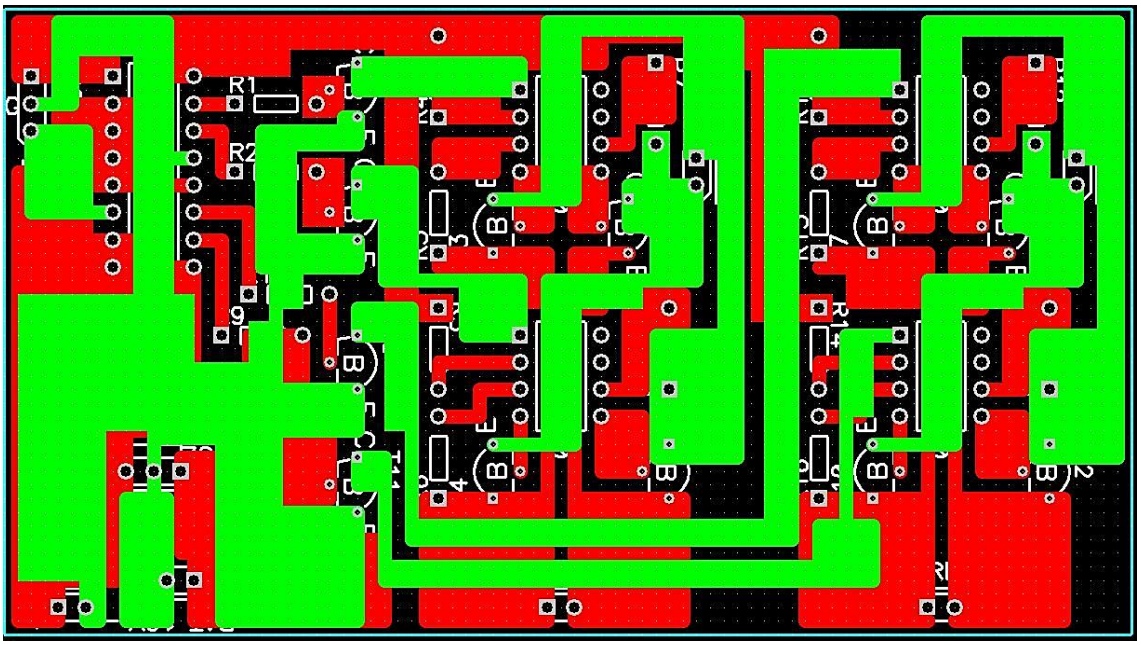


Trigger 2 – Circuito duplicado. O CI *7476* apresenta quatro saídas (portas Q e $\overline{Q}$; Q1 e $\overline{Q1}$) o que possibilitou duplicar o circuito. Dessa forma dois geradores de corrente podem ser utilizados.

PCB

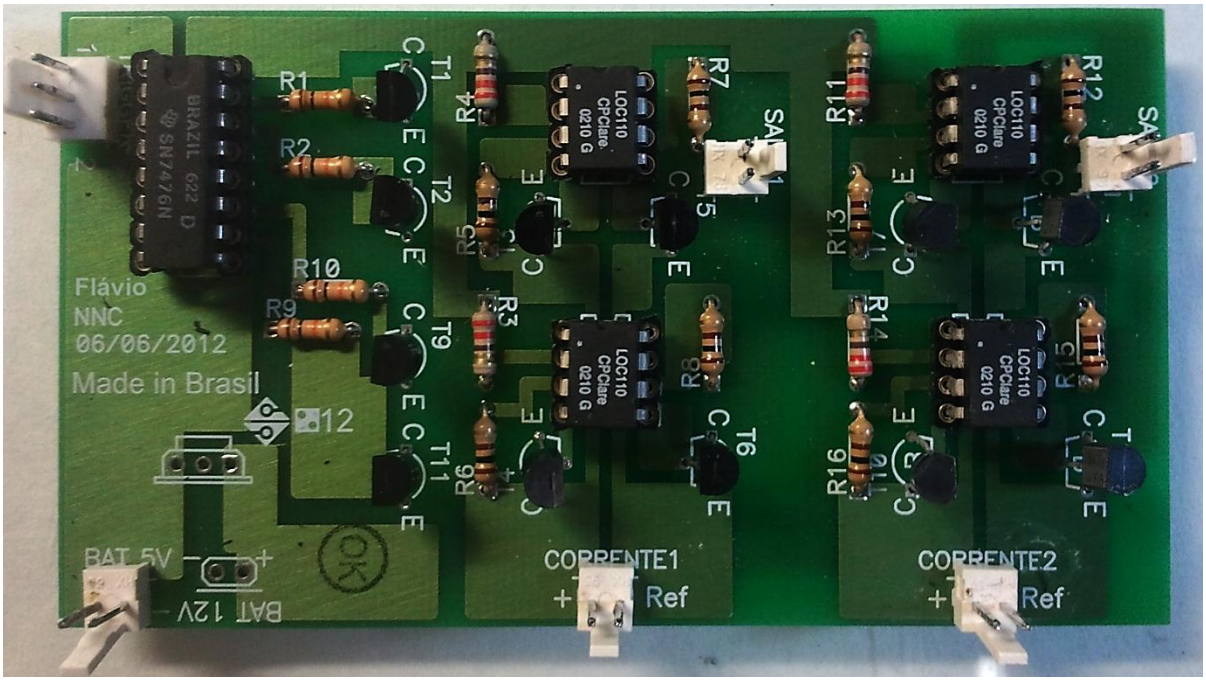


**Top*



**Bottom*

Placa Montada



1.3 TRIGGER BIFÁSICO

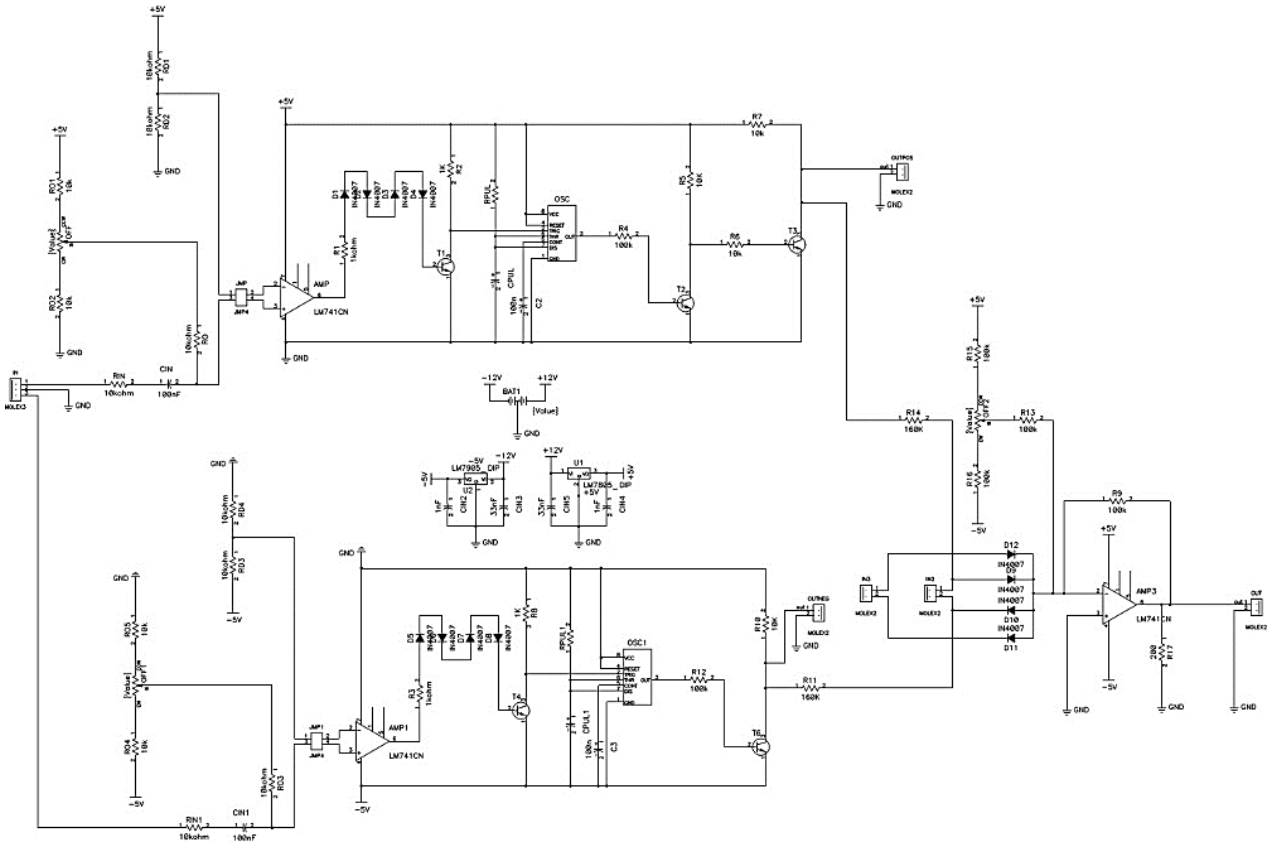
(Desenvolvido pelo Prof. Márcio Moraes, Flávio Mourão e pelo aluno de iniciação científica Pedro Lopes)

Com a aquisição pelo laboratório de um novo estimulador elétrico (DIGITIMER Ltd – *Isolated Stimulator Model DS4 with Biphasic Constant Current output*), no caso um gerador de corrente bifásico, construímos um novo circuito para temporização dos pulsos. A construção desse sistema beneficiará não só o presente projeto, mas também outros trabalhos que utilizam técnicas de microestimulação elétrica.

Baseado no ideia anterior associamos dois circuitos de trigger a um estágio somador, construído com um amplificador operacional LM 741, de forma a agregar duas ondas, uma positiva e outra negativa.

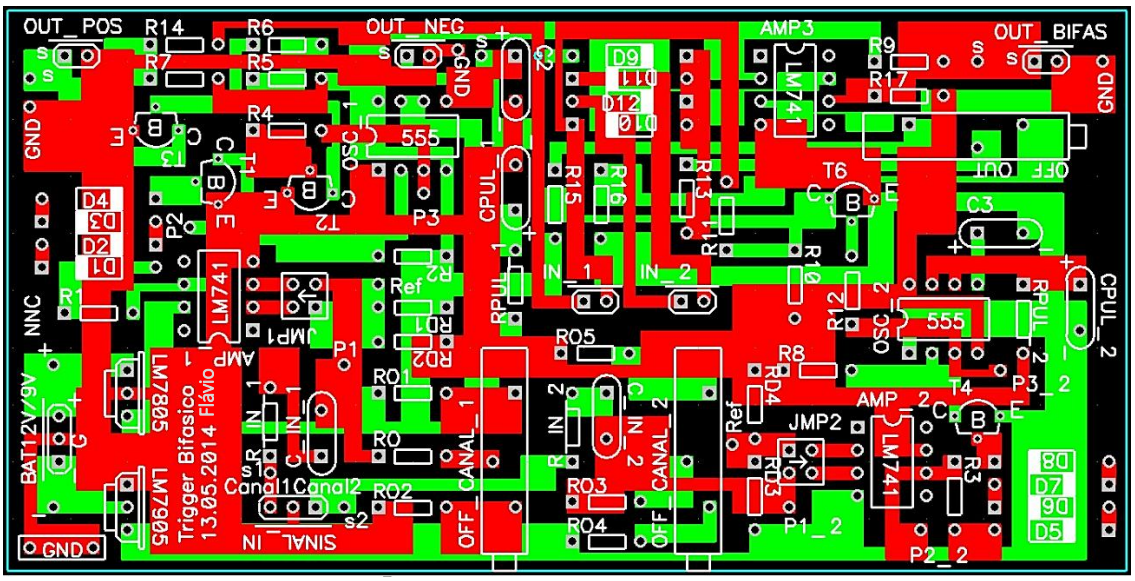
O novo circuito apresenta-se associado a conversores de tensão (LM 7805 e LM7905) e além de uma saída bifásica, apresenta saídas para pulsos monofásicos positivos e/ou negativos. Para o pulso negativo, adaptamos o circuito original retirando o sinal a partir do coletor de T2 (transistor BC 547).

De acordo com a nova arquitetura o sistema apresenta além de saídas para sinais quadráticos, monofásicos, positivos e/ou negativos, com tensão fixa de 5 V, saídas para sinais quadráticos, bifásicos, com tensão modulada até 2,5 V. Assim, como o circuito original, os comprimentos de onda também podem ser modulados.

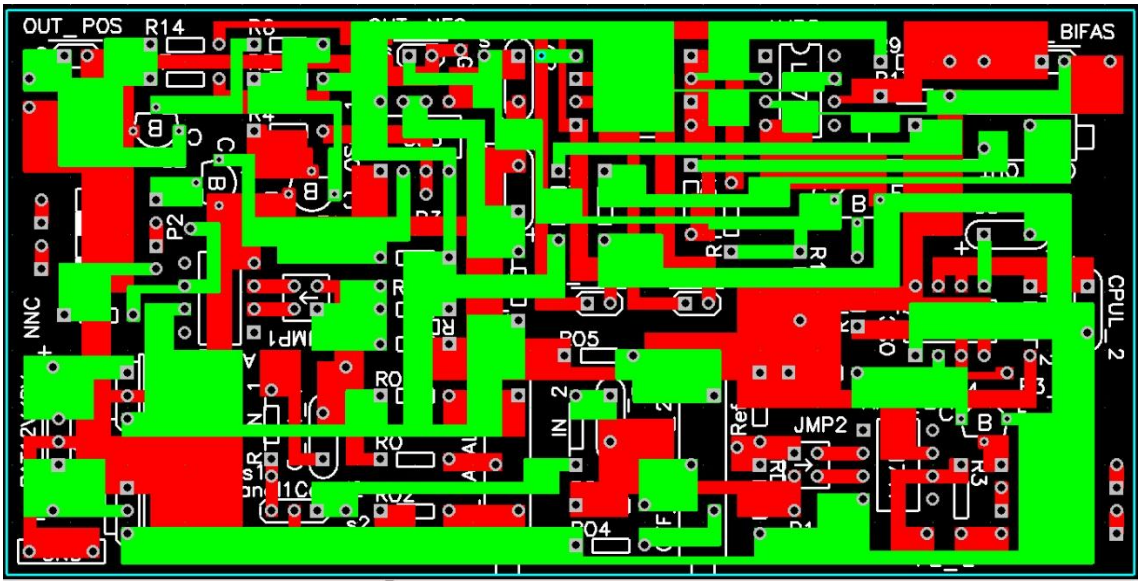


Exemplo: (+) Rpul – 1k Ohm e Cpul – 100 nF ----> Rpul x Cpul (1000 x 0,0000001) = 0,0001 s ---> **100 µs**
(-) Rpul1 – 1 kOhm e Cpul1 – 100 nF ----> Rpul x Cpul (1000 x 0,0000001) = 0,0001 s ---> **100 µs**

PCB



**Top*

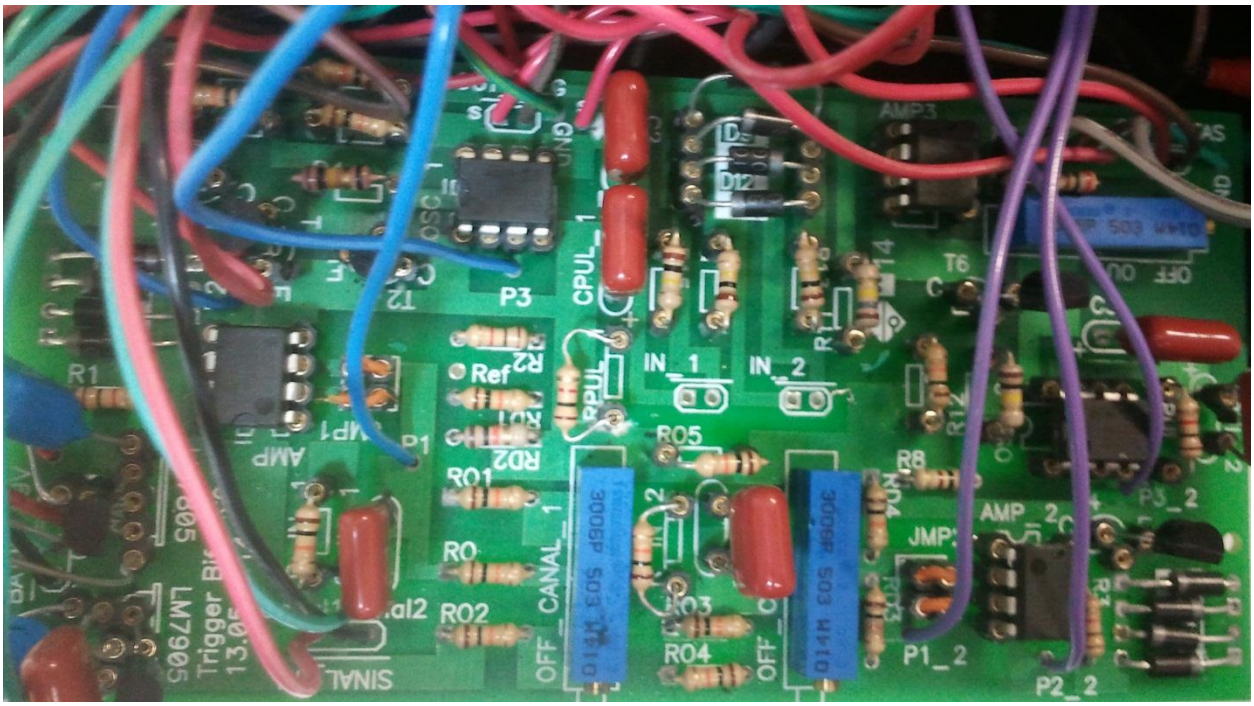


**Botton*

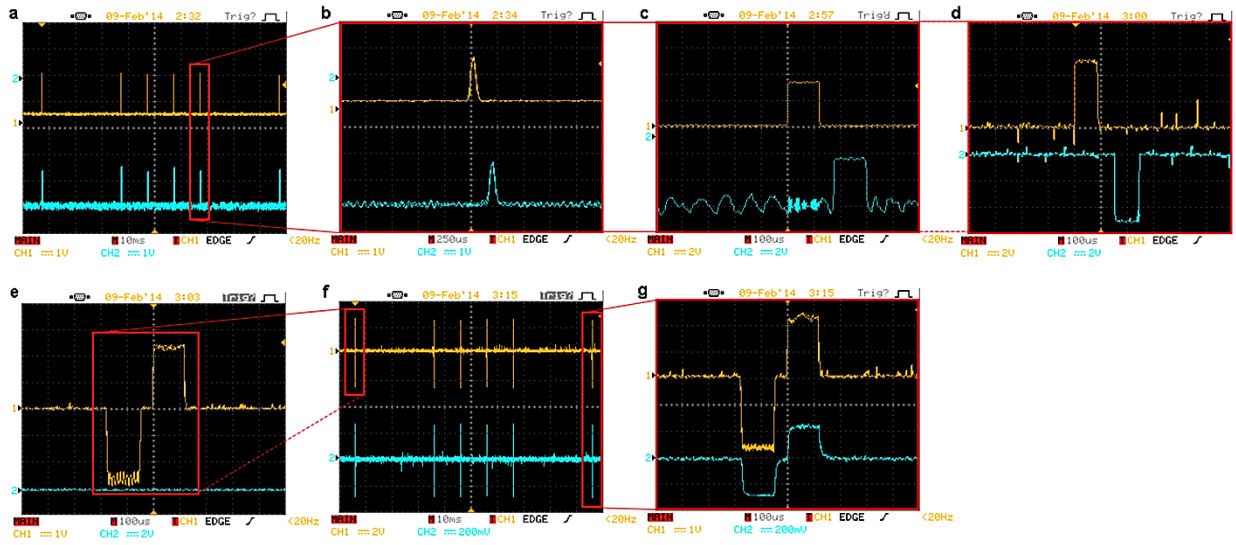
Saídas Secundárias e Pontas de prova (P):

+, –: *Prova bateria/* ***S1:*** *Prova sinal áudio canal 1/* ***S2:****Prova sinal áudio canal 2/* ***REF:*** *Divisor de tensão/* ***P1:*** *regulagem do offset (+),* ***P1_2:*** *regulagem do offset (-)/* ***P2:*** *saída do amplificador (+),* ***P2_2:*** *saída do amplificador (-)/* ***P3:*** *Saída do oscilador (+),* ***P3_2:*** *Saída do oscilador (-)/* ***OUT_POS:*** *Saídas pulso positivo (5 V),* ***OUT_NEG:*** *Saídas pulso negativo (5v),* ***OUT_BIFAS:*** *Saídas pulso bifásico (≤ 2,5 V)/* ***S:****Provas saídas sinal.*

Placa Montada



Audio → Trigger → Corrente [Microestimulação]



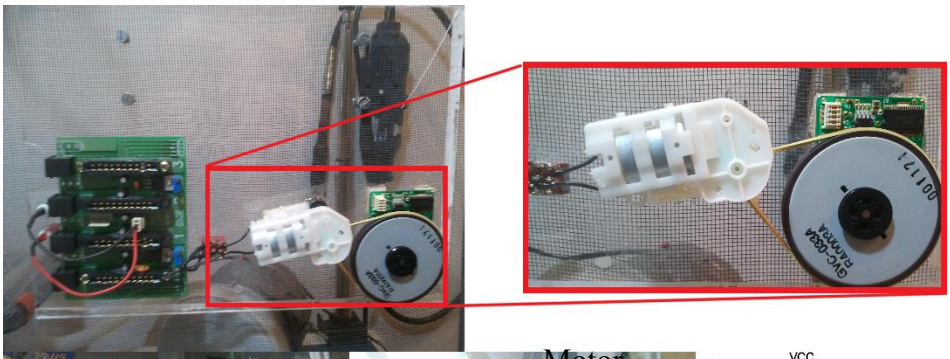
Leitura osciloscópio. a, *áudio (**Padrão A**, IPI=10ms, canal 1 & canal 2)/* **b,** *sinal de áudio (escala 250 µs)/* **c,** *Saída oscilador (LM 555 – OSC_1 canal 1 & OSC_2 canal 2)/* **d,** ***OUT_POS*** *(Pulso positivo) &* ***OUT_NEG*** *(Pulso negativo) /* **e,** *Saída circuito somador/* **f,** ***Padrão A.*** *Trigger (canal 1) & Saída gerador de corrente (canal 2)/* **g,** *Sinal com escala de 100 µs. Microestimulação com 25 µA a partir de 2.5 V (Trigger) (carga de medida 10 kOhm).*

2. MICROMANIPULADOR – DESCIDA E SUBIDA AUTOMÁTICA

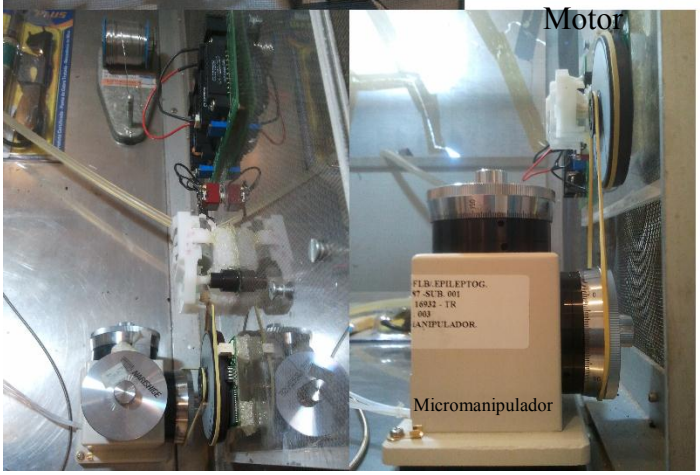
(Desenvolvido por Flávio Mourão)

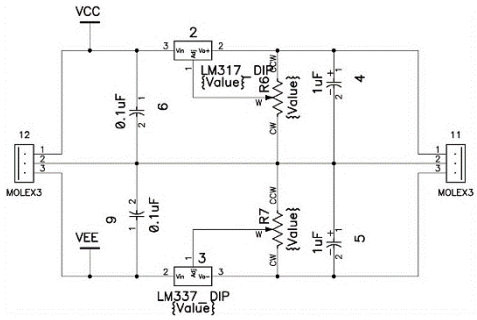
Para a descida dos eletrodos de registro em suas respectivas regiões de interesse, construímos um sistema automático, alimentado com 12 V e que movimenta um micromanipulador a uma velocidade constante de aproximadamente 200 µm/min.

O Sistema consta de um pequeno motor de vídeo cassete associado a uma fonte de tensão regulável (LM 317 e LM 337) e roldanas. Basicamente diferentes tensões (≤ ±12 V) acionam o motor com diferentes velocidades. Adicionamos 3 estágios de roldanas, garantindo dentro de nossas limitações, uma velocidade constante e mínima possível.

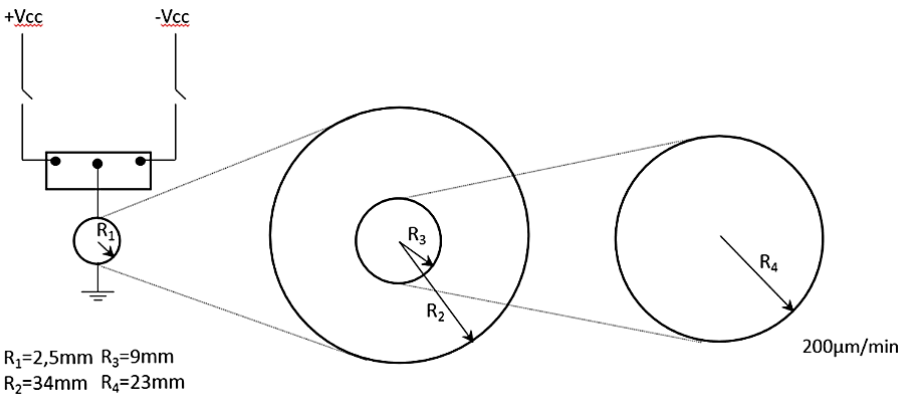


Motor





Fonte regulada
±12 V → ±4.7 V



3. SETUP DE CONDICIONAMENTO OPERANTE

3.1 MÓDULO DATAQ®

Para o controle do sistema utilizamos O módulo DI-148U. É um módulo parametrizável de aquisição de dados fabricado pela DataQ Instruments®. Ele possui oito entradas analógicas (*analog channels*) e seis portas digitais multifuncionais (D0 – D5), que podem ser usadas como entradas ou saídas, como mostrado abaixo. Este módulo ainda possui um porta Universal Serial Bus (USB). Duas entradas analógicas e uma saída digital são usadas: o *clock*, proveniente do oscilador astável, a tensão do sensor de infravermelho e o sinal para acionar a placa de processamento. Também é usado uma saída digital para acionar cada um dos motores, utilizados no caso para abrir/fechar os compartimentos onde serão armazenadas as recompensas.

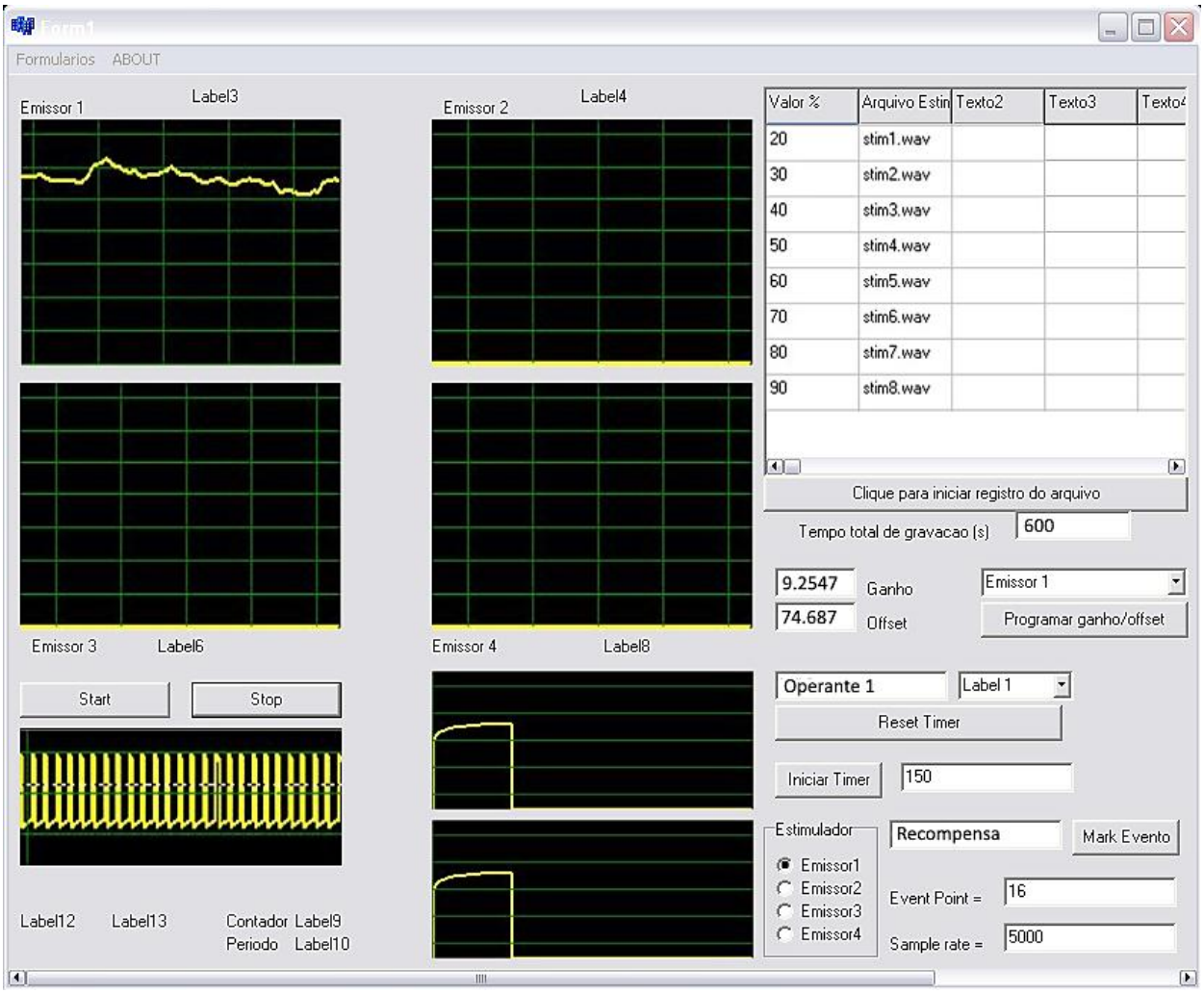
**Módulo 148U DataQ ® mostrando entradas e saídas*

3.2 SOFTWARE

(Desenvolvido pelo Prof. Márcio Moraes)

O software utilizado foi desenvolvido em C++ e é capaz de receber os dados (níveis de tensão, corrente, aberto/fechado), exibir os sinais e permitir a calibração do sistema. O*ffsets p*odem ser calibrados para cada um dos níveis de tensão dos emissores além de limiares (*thresholds*) de estimulação. Uma interface gráfica é disponibilizada para identificar a origem do alinhamento do receptor, baseado na multiplexação no tempo e do sinal de *trigger* registrado. O software permite a programação do módulo DataQ® através do driver ActiveX fornecido pelo fabricante, determinando quais entradas analógicas e saídas digitais serão usadas e quais parâmetros do *software* corresponderão à esses sinais. O software é responsável por determinar, a partir do nível de tensão medido no receptor, qual padrão de estimulação será utilizado, permitindo ao operador a escolha da estimulação a ser aplicada, de acordo com dez faixas de potência entre o mínimo e máximo de tensão. Ainda, o *software* permite configurar a função de transferência que aciona a abertura dos motores. Na tela do software são exibidos o *trigger* e até quatro emissores simultaneamente.

Na Figura podemos ver as janelas: superiores à esquerda, nível de tensão do alinhamento entre cada um dos grupos de emissores e o receptor. Superior à direita, planilha com os arquivos de estimulação elétrica carregados. No canto inferior esquerdo representa o *trigger* com respectivo limiar, na parte inferior direita o nível de tensão no receptor (superior) e o sinal de estimulação utilizado (inferior). Para evitar saturações de sinal, permite-se calibrar os eixos de cada uma das janelas. A calibração ainda permite alterar tanto o nível de tensão quanto o período dentro de cada janela, permitindo um histórico recente e em tempo real.



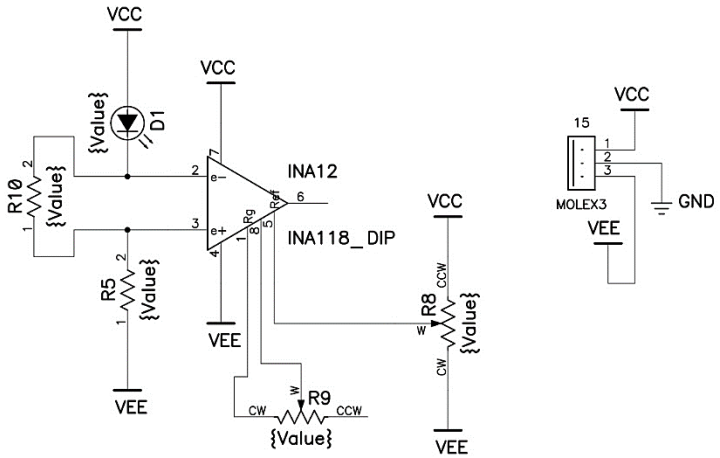
*Tela de visualização do software

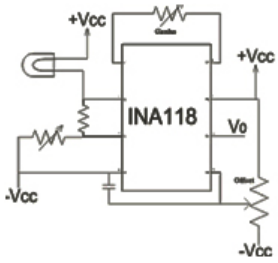
3.3 AMPLIFICADOR DE SINAL - RECEPTOR ARTIFICIAL

(Desenvolvido pelo Prof. Márcio Moraes, Flávio Mourão e pelo aluno de iniciação científica Thiago Louback)

O sinal natural gerado pelo receptor ao receber luz infravermelha não é adequado do ponto, pois a alteração na resistência é pequena e difícil de ser comparada. Por esse motivo, utiliza-se um circuito capaz de amplificar e transformar essa variação de resistência em variação de tensão. O tratamento do sinal, além de amplificar, controla o ganho da amplificação e o *offset* da referência de entrada, evitando a saturação na saída do amplificador. Tal decisão permite que o circuito seja parametrizado para uso de acordo com as necessidades dos protocolos. Assim foi projetado um circuito amplificador com um CI INA118, amplificador de instrumentação e quatro resistores, um fixo e três variáveis. O INA118 foi utilizado pois permite que seu ganho seja alterado através da variação da resistência existente entre os pinos 1 e 8, chamado de resistor de ganho (Rg). A fórmula de ganho é dada por:

$$G = 1 + \frac{50k\Omega}{RG}$$





**esquemático 2*
Opção de um capacitor de 100nF na saída do offset (pino 4 e 5 INA_118)

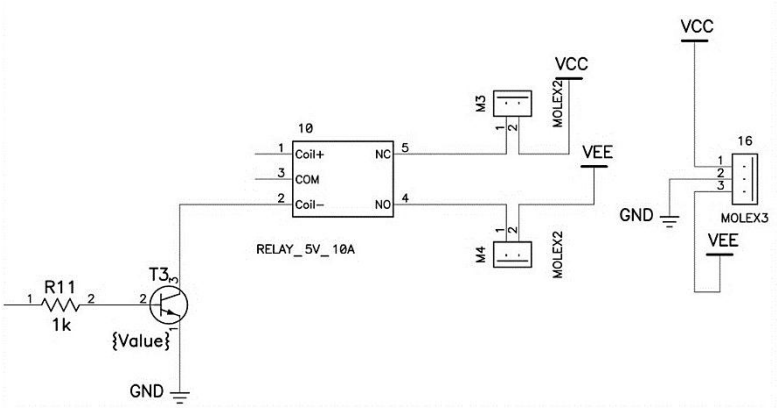
*Os resistores devem ser escolhidos de acordo com a distância entre a emissão e a recepção do sinal, assim como ajuste do ganho e o *offset*.

Além disso, o INA118 possui um pino de tensão de referência (pino 5) que pode ser usado para fazer com que o circuito trabalhe em outro ponto de operação desejado, diferente do terra (GND, *ground*). O circuito foi montado de tal forma que um dos resistores variáveis seja responsável por controlar o ganho do circuito, outro responsável por controlar a tensão de referência (*offset*) e o terceiro para controlar o divisor de tensão formado em série com o receptor, ligados entre +9 V e –9 V. Um capacitor de 10 nF foi colocado entre os pinos 4 e 5 visando isolar o pino de referência do GND.

3.4 CIRCUITO DE RELÉS – ABERTURA E FECHAMENTO DAS PORTAS

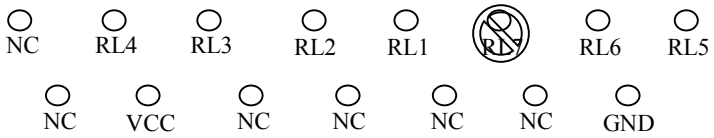
(Desenvolvido pelo Prof. Márcio Moraes, Flávio Mourão e pelo de doutorado João Nitzsche)

A placa que controla o acionamento dos motores é composta de um conector, sete relés e um CI ULN2003. O conector permite que sejam conectados, simultaneamente várias entradas, praticamente na mesma posição da placa, para servirem de entrada do CI ULN2003. Este sinal é binário e comanda o acionamento dos relés, responsáveis por ligar os motores. Os motores são desligados pelas chaves fim-de-curso, presentes na estrutura de acrílico. A placa é alimentada com 5 V.



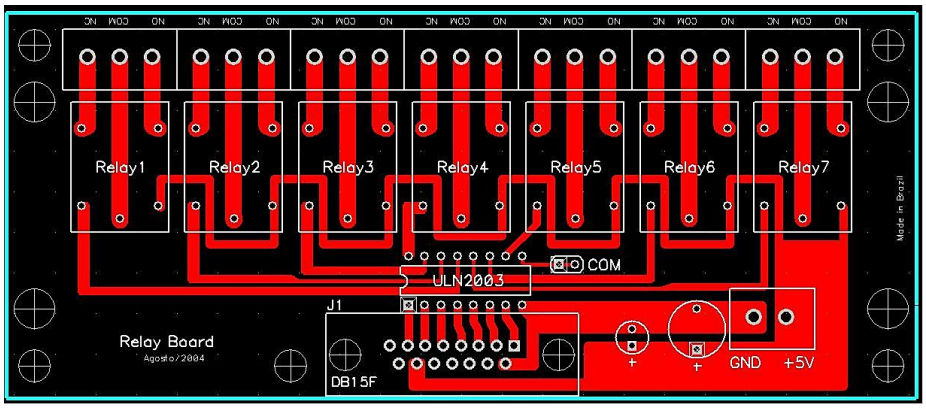
*esquemático

CONECTOR DB MACHO 15 PINOS
SAÍDA → DATAQ



PCB

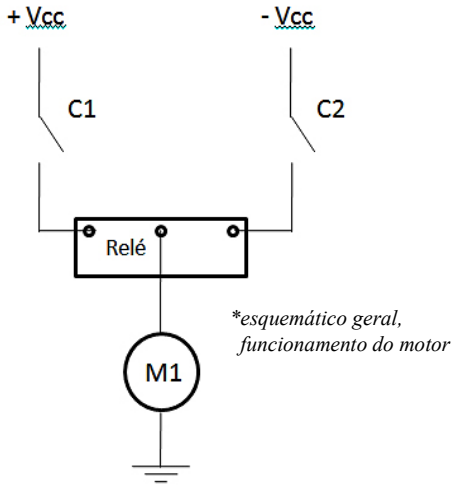
RELÉ	DATAq
RL1	D0
RL2	D1
RL3	D2
RL4	D3
RL5	D4
RL6	D5
RL7	-



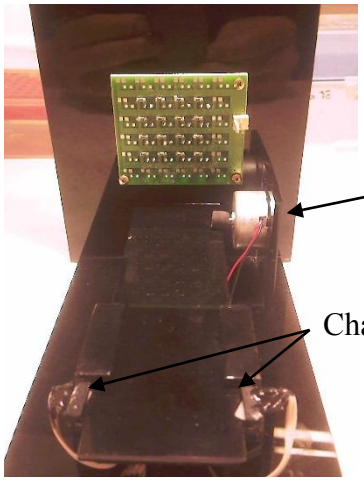
* Placa de Relé anteriormente desenvolvida no laboratório.

Considerando que todos os componentes do circuito ao lado são binários e que as chaves fim de curso são normalmente fechadas (fechadas em 0 e abertas em 1), podemos fazer a tabela quanto a saída do motor a partir dos valores individuais dos bits que representam os estados das chaves e do relé. Quando o motor é alimentado com + Vcc ele gira em uma direção, abrindo o compartimento, quando é alimentado com - Vcc ele gira no sentido contrário, fechando o compartimento. Como as chaves são normalmente fechadas, não existe um estado no qual C1 e C2 estão simultaneamente em 1. Casos em que ambas as chaves estão em 0 ocorrem sempre em processo de deslocamento, para abrir ou fechar.

C1	C2	RELÉ	SAÍDA	RESULTADO
0	0	0	+Vcc	Motor “abre”
0	1	0	+Vcc	Motor “abre”
1	0	0	0 V	Motor Parado (compartimento aberto)
1	1	0	Não existe	-
0	0	1	-Vcc	Motor “fecha”
0	1	1	0 V	Motor Parado (compartimento fechado)
1	0	1	-Vcc	Motor “fecha”
1	1	1	Não existe	-



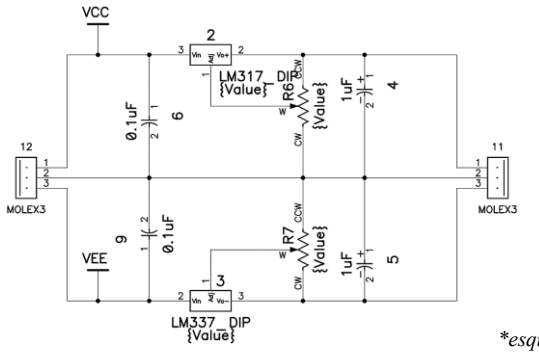
*esquemático geral, funcionamento do motor



3.5 REGULADOR DE TENSÃO

(Desenvolvido pelo Prof. Márcio Moraes)

Circuito regulador de tensão (semelhante ao utilizado no micromanipulador, descrito anteriormente, para descida dos eletrodos) para o funcionamento dos motores de abertura e fechamento dos compartimentos. ± 12 V -------> ± 5 V.



*esquemático

3.6 CONTROLADOR DO PROCESSAMENTO DE PULSOS DE INFRAVERMELHO

(Desenvolvido pelo Prof. Márcio Moraes e pelo aluno de doutorado João Nitzsche)

A placa de processamento é responsável por receber o sinal de liga/desliga do DataQ® e multiplexar o acendimento de cada um dos grupos de emissores presentes no labirinto. Ela foi desenvolvida para acionar até dezesseis grupos de emissores simultaneamente. O sinal de "liga" aciona um circuito integrado (CI) NE555 (modo astável), como um oscilador de período de 1ms. Este oscilador funciona como um temporizador (*clock*) para um contador do tipo 74LS193 (0 até 15). Como o contador possui somente quatro saídas em código binário, para acionar os dezesseis grupos separadamente, as quatro saídas são ligadas a dois demultiplexadores (*demux*) 74LS138 de oito saídas cada. Assim, utiliza-se o bit mais significativo (MSB – *Most Significant Bit*) da saída do contador, como seletor do *demux*, ligado diretamente ao set de um e barrado no set do outro. Desse modo, ao contar de 0 até 7 (0000 – 0111), o MSB está em 0, ativando o demux superior e desativando o *demux* inferior. Contando de 8 até 15 (1000 – 1111), o MSB está em 1, ativando somente o *demux* inferior. Os três bits menos significativos (LSB – *Least Significant Bit*) da saída do contador são ligados como entrada de ambos os *demux*, ativando, por sua vez, cada uma das respectivas saídas.

Como as saídas de um *demux* não podem fornecer corrente suficiente para acionar um LED, foi utilizado um CI ULN2003, que possui circuitos com pares *darlington* capazes de gerar a corrente necessária para acionar a placa de emissores. Como as portas deste CI são ativadas em 0, foram utilizados outros dois inversores, CI 7404, para tornar a lógica ativa em 1. Caso não sejam usados todos os grupos de LED's, pode-se ligar uma saída do *demux* ao reset do contador, fazendo com que a contagem seja reiniciada nesse ponto.

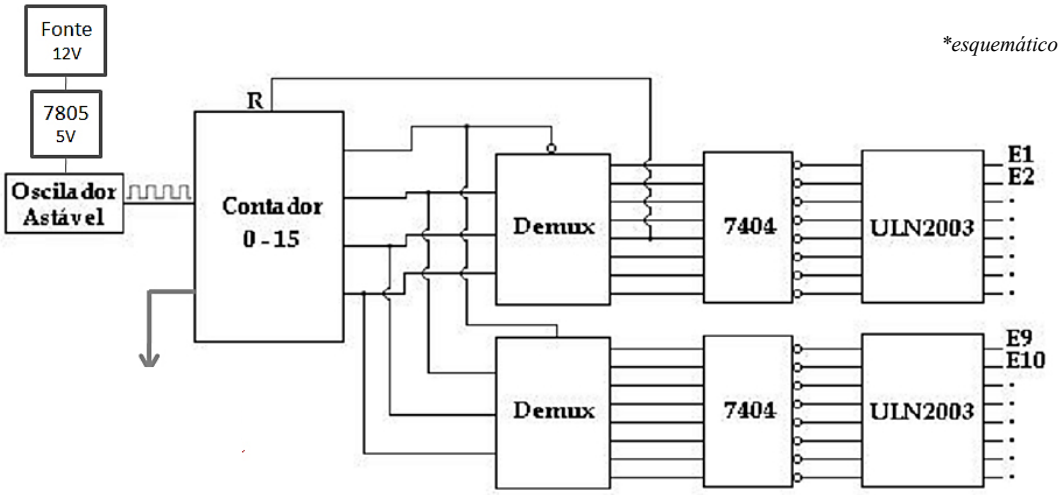
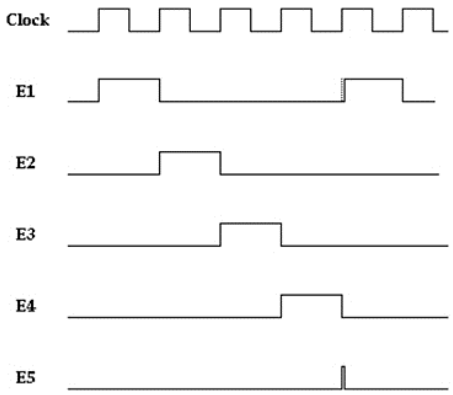


**diagrama de blocos do sistema, onde temos um exemplo usando quatro grupos de LED's, portanto, a saída 5 do demux está ligada ao reset do contador.*

Para multiplexação no tempo do acendimento dos emissores e a sincronização entre o sinal de multiplexação (*trigger*) e o sinal de recepção, foi definido um período dentro do qual cada um dos emissores estaria aceso durante uma janela fixa de tempo, ou seja, em qualquer instante de tempo, somente um dos emissores estaria aceso. Dessa forma, pode-se comparar o sinal de tensão

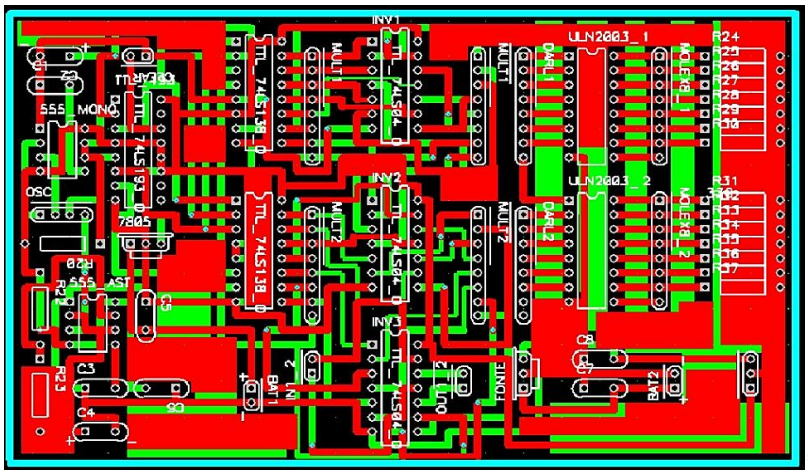
do receptor com o "*trigger*" usado para acender os emissores, gerando um sinal filtrado para cada um deles.

O esquema abaixo mostra um período no qual cada um dos grupos de emissores é mostrado. Como exemplo, foram usados somente quatro grupos de emissores que, ao acionar o grupo E5, somente um pulso é gerado, ativando novamente o grupo E1. O tempo desse pulso não está mostrado em escala e é insignificante do ponto de vista do sistema, sendo somente o tempo necessário para que o contador seja reiniciado.

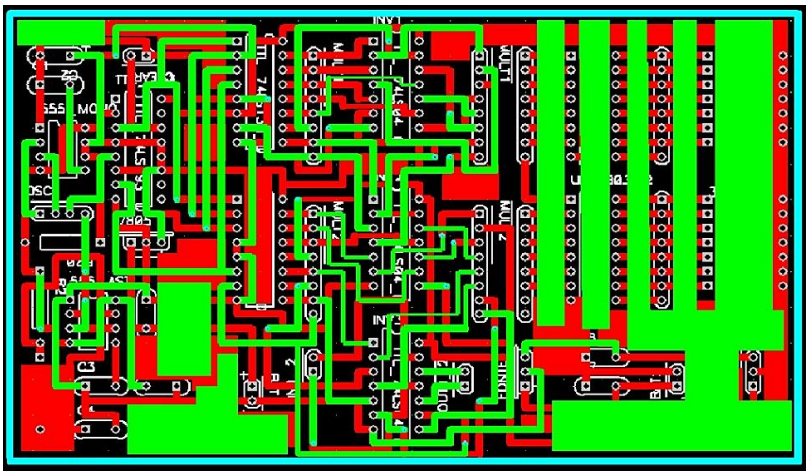


**Janela temporal de acendimento dos emissores*

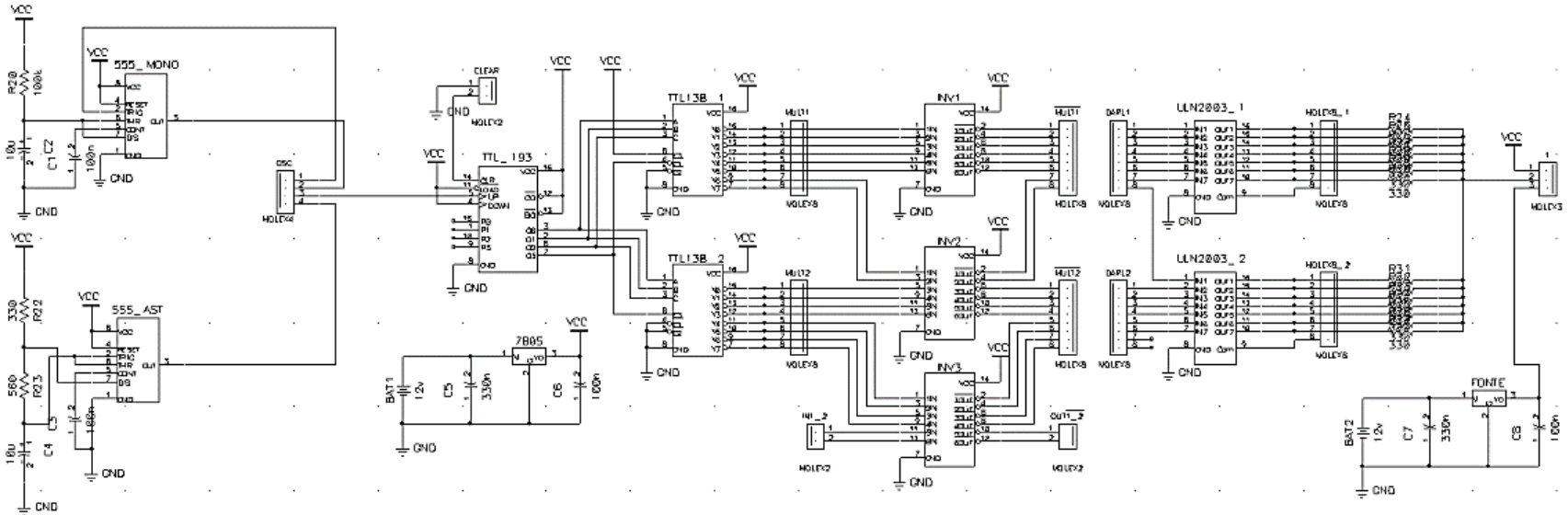
PCB



**Top*



**Botton*

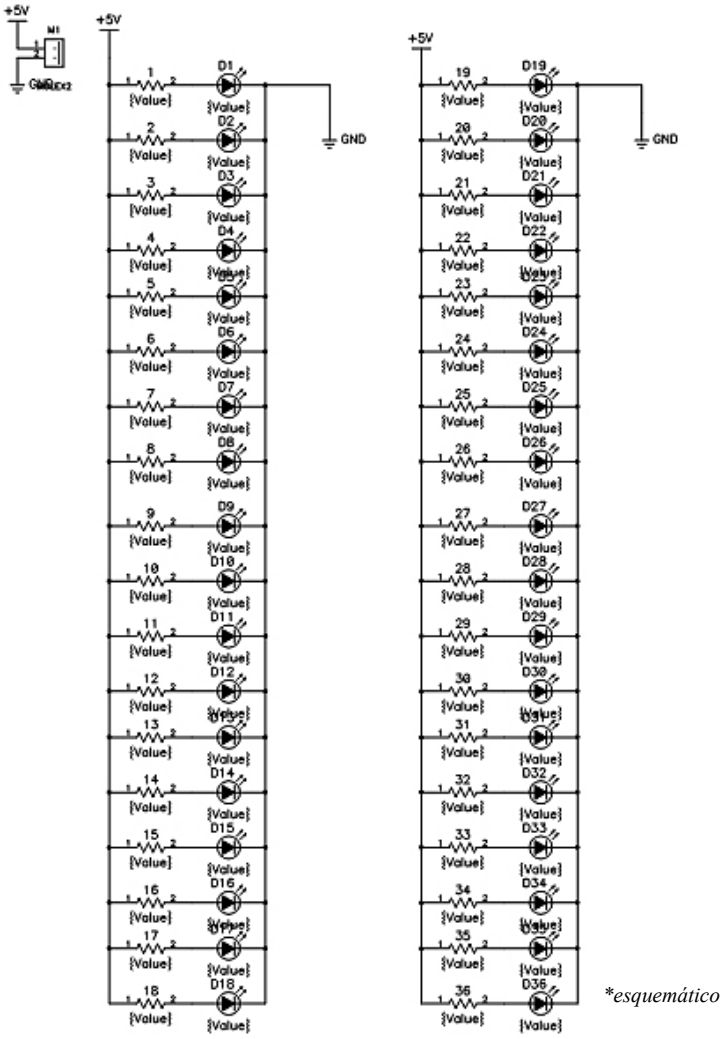

VCC
555_MONO
555_AST
TTL_193
TTL13B_1
TTL13B_2
7805
ULN2003_1
ULN2003_2
INV1
INV2
INV3
CLEAR
FONTE
GND
BAT1
BAT2
12v

*Diagrama

3.7 EMISSÃO EM INFRAVERMELHO

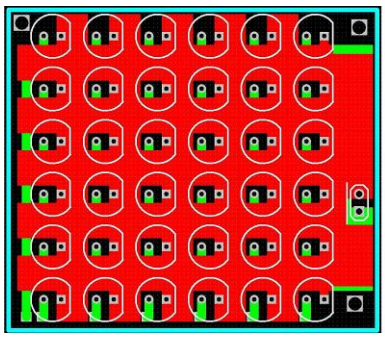
(Desenvolvido pelo Prof. Márcio Moraes e pelo aluno de iniciação científica Thiago Louback)

Circuito idealizado para posicionamento à frente da plataforma de condicionamento. Resistores SMD (Sugerido 220Ω).

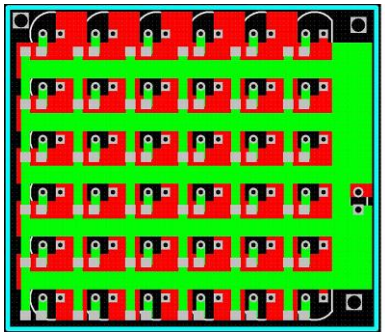


*esquemático

PCB

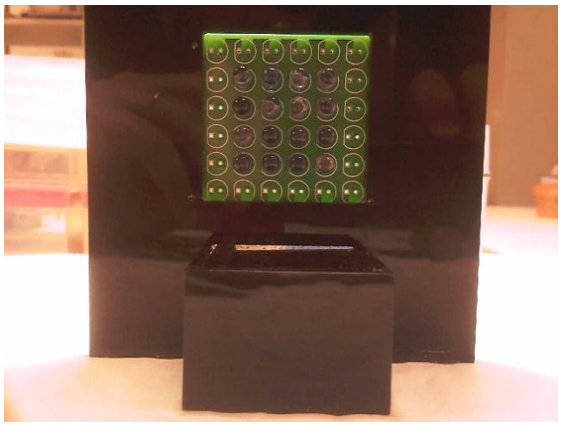


*Top



*Bottom

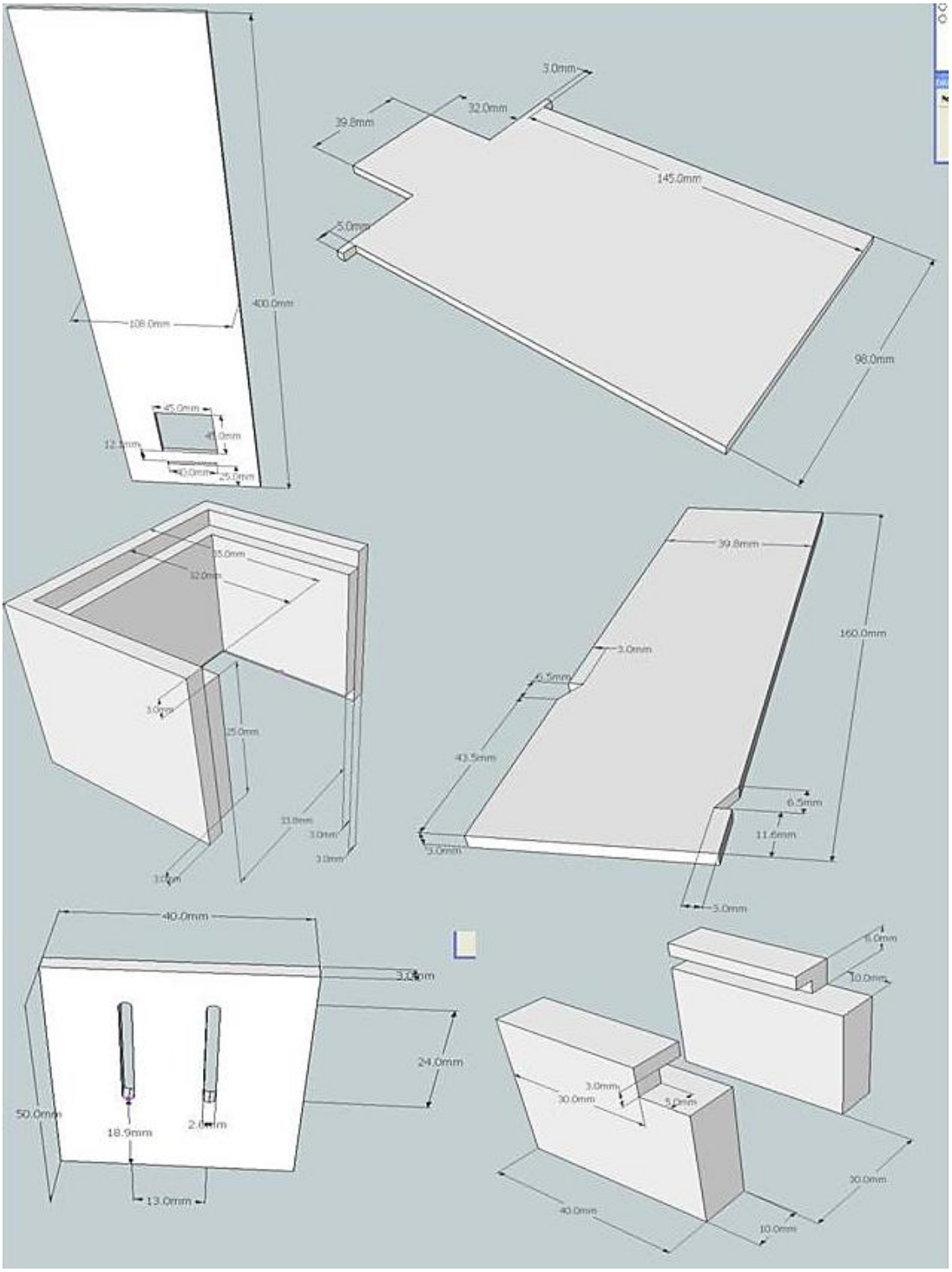
Plataforma de Condicionamento

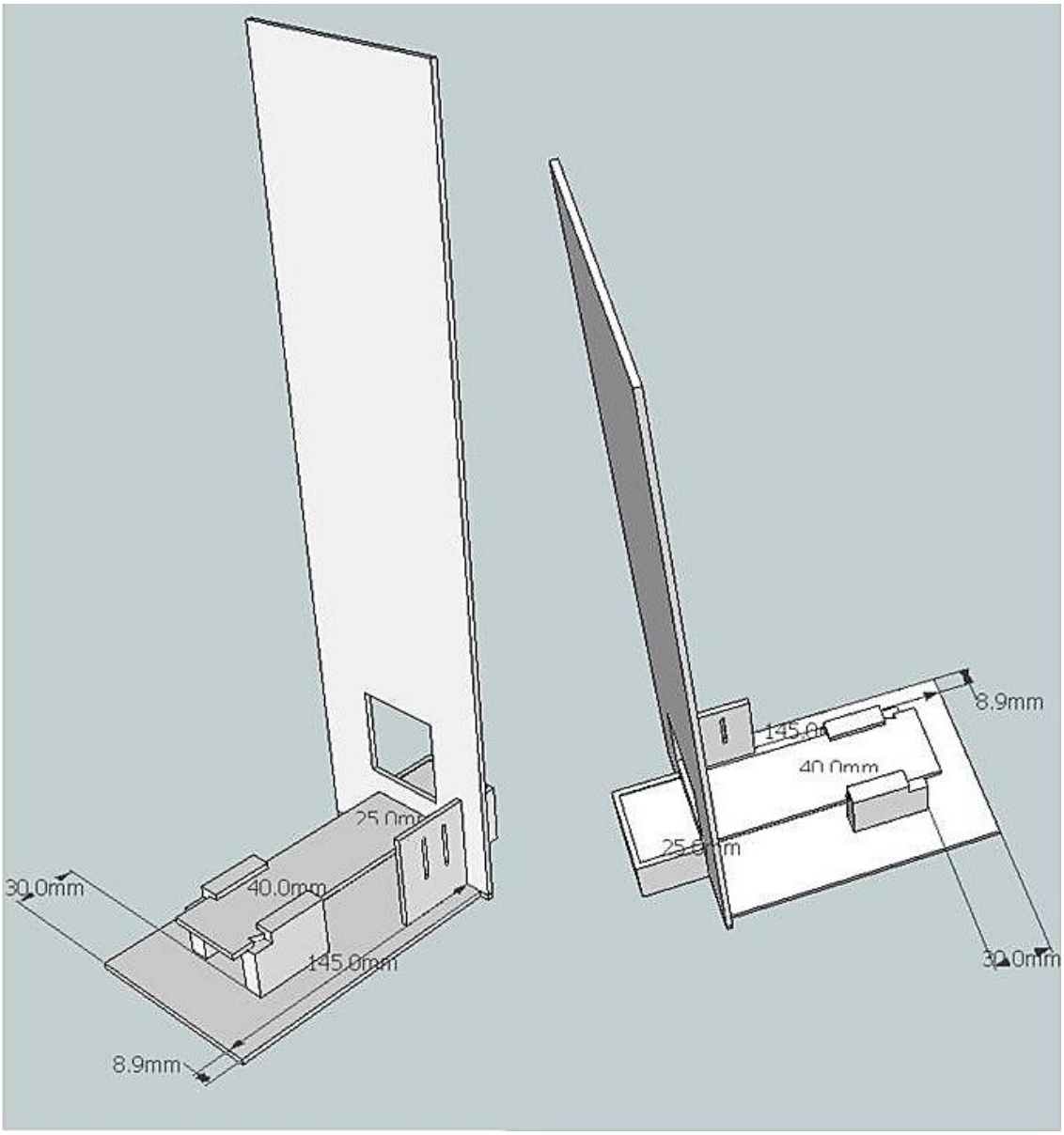


3.8 PLATAFORMA DE CONDICIONAMENTO

(Desenvolvido pelo Prof. Márcio Moraes, Flávio Mourão e pelo aluno de doutorado João Nitzsche)

Diagramas: Plataformas de condicionamento posicionadas no labirinto. Material: Acrílico Preto




30.0mm
40.0mm
145.0mm
8.9mm
8.9mm
30.0mm

ANEXOS

From: strickp@pitt.edu

To: mfdm@icb.ufmg.br

CC:

Subject: Cerebral Cortex - Manuscript Decision - CerCor-2014-00766.R2

Body: 06-Dec-2014

CerCor-2014-00766.R2
Triggering different brain-states using asynchronous serial communication to the rat amygdala

Dear Dr. Moraes,

I am pleased to inform you that your manuscript is acceptable for publication in Cerebral Cortex and will appear in a forthcoming issue. Your manuscript will now be sent through to Oxford University Press for publication.

OPTIONAL OPEN ACCESS - Cerebral Cortex authors can opt, at an additional charge, to make their paper freely available online to all immediately upon publication, as part of the Oxford Open initiative.

Applicable Open Access charges can be found at http://www.oxfordjournals.org/jnls/list/cercor/instauth/general.html. If you do not select the Open Access option, your paper will be published in the journal with standard subscription-based access and you will not be charged.

In order to publish your article, Oxford University Press requires that you complete a license agreement online. The Production Editor at Oxford University Press will provide a link to the online licensing system, and instructions on how to select and complete a license, to you in due course.

Please also note that there are page charges of $60 per published page and that publication of any color figures will incur an additional cost, unless they are to be published online as supplemental data. Please see the Instructions to Authors at http://www.oxfordjournals.org/cercor/for_authors/index.html for full details.

We welcome your suggestions for cover illustrations. Please send your illustrations to Michelle Pizzuti (michelle.pizzuti@yale.edu).

Thank you for submitting your work to Cerebral Cortex.

Yours sincerely,

Dr. Peter Strick
Reviewing Editor, Cerebral Cortex
strickp@pitt.edu

Date Sent: 06-Dec-2014

Cerebral Cortex Advance Access published January 21, 2015

OXFORD

Cerebral Cortex, 2015, 1–12

doi: 10.1093/cercor/bhu313
Original Article

ORIGINAL ARTICLE

Triggering Different Brain States Using Asynchronous Serial Communication to the Rat Amygdala

Flávio Afonso Gonçalves Mourão, André Luiz Vieira Lockmann, Gabriel Perfeito Castro, Daniel de Castro Medeiros, Marina Pádua Reis, Grace Schenatto Pereira, André Ricardo Massensini, and Marcio Flávio Dutra Moraes

Núcleo de Neurociências (NNC), Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Address correspondence to M.F.D. Moraes, NNC—Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antonio Carlos, 6627, CEP 31270-901 Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Email: mfdm@icb.ufmg.br

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

Abstract

Inputting information to the brain through direct electrical microstimulation must consider how underlying neural networks encode information. One unexplored possibility is that a single electrode delivering temporally coded stimuli, mimicking an asynchronous serial communication port to the brain, can trigger the emergence of different brain states. This work used a discriminative fear-conditioning paradigm in rodents in which 2 temporally coded microstimulation patterns were targeted at the amygdaloid complex. Each stimulus was a binary-coded "word" made up of 10 ms bins, with 1's representing a single pulse stimulus: A-1001111001 and B-1110000111. During 3 consecutive retention tests (i.e., day-word: 1-B; 2-A, and 3-B), only binary-coded words previously paired with a foot-electroshock elicited proper aversive behavior. To determine the neural substrates recruited by the different stimulation patterns, c-Fos expression was evaluated 90 min after the last retention test. Animals conditioned to word-B, after stimulation with word-B, demonstrated increased hypothalamic c-Fos staining. Animals conditioned to word-A, however, showed increased prefrontal c-Fos labeling. In addition, prefrontal-cortex and hypothalamic c-Fos staining for, respectively, word-B- and word-A-conditioned animals, was not different than that of an unpaired control group. Our results suggest that, depending on the valence acquired from previous learning, temporally coded microstimulation activates distinct neural networks and associated behavior.

Key words: amygdaloid complex, electrical microstimulation, fear-conditioning, prefrontal cortex, temporal coding

Introduction

One important question in neuroscience is to unveil how the brain encodes the information it receives from the multitude of sensors spread throughout the human body (Mesulam 1998). Our senses have specialized cells working as transducers that convert physical and/or chemical stimuli into neuronal signals. The first step of encoding can be measured as transmembrane potential changes in the receptor portion of the sensory neurons. Afterwards, these signals have to be transmitted throughout relatively great distances; which poses an engineering challenge that has found its solution in evolution by encoding data digitally (i.e., the action potential) and modulating intensity by Pulse-Frequency-Modulation (Adrian 1964). This latter form of encoding is generally termed Rate Coding; which, in addition to the anatomical specificity of the sensory modality, composes the building blocks of the "language neurons speak" and can be used to either read from or write to a living brain (Olds and Milner 1954; Heynen and Bear 2001; Talwar et al. 2002; O'Doherty et al. 2011). However, as signals propagate from caudal to more rostral neural networks, the encoding processes become increasingly more complex and less localized in terms of anatomy, making rate coding of any individual neuron too imprecise to properly

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

represent any given attribute (Varela et al. 2001). Although it is still a matter under debate if information is encoded within very small neuronal sets (Quiroga et al. 2005) or distributed among large neuronal populations forming a unique pattern of activation (Rumelhart and McClelland 1986), it is a general consensus that we have just began to fathom the brain's potential to encode information (Rolls and Treves 2011). Time–frequency analyses of LFP recordings, associated with multiunit multielectrode recordings, have contributed much to a compromise solution among the sparse versus distributed coding frameworks (Engel et al. 2001; Buzsaki and Draguhn 2004). An additional complicating factor is that external stimuli processing may even differ from one presentation to another depending on the intrinsic oscillatory activities of the brain at any given moment in time. The time-dependent brain states, which are involved in such top-down modulation, are an important aspect of the sensory-motor integration and may be triggered by the external stimuli itself, generated endogenously or even dynamically formed or modified by learning processes (Engel et al. 2001). Womelsdorf and Fries (2006) have shown that context-dependent phase synchronization of local field potential (LFP) oscillatory activity, from different brain areas, may play a key role in facilitating/modulating sensory input to dynamically activate a motor response for appropriate and flexible sensory-motor coordination (Greenstein et al. 1988; Pavlides et al. 1988; Hyman et al. 2003; Womelsdorf and Fries 2006; Manzur et al. 2013). Therefore, the many oscillators that compose the rhythms of the brain (Buzsáki 2006) may play a key role in synchronizing specific neurons embedded in adjacent or distal neural networks that, nonetheless, compose a relatively precise spatiotemporally organized engram that, in turn, is associated with a perceptual object. The dynamics of such continuous temporal integration, organizing increasingly more complex neural networks in time, may hold the solution of an appropriate sensory-motor response (Singer 1999, 2009).

The importance of quantifying neural synchrony associated to function has stimulated the development of a number of mathematical tools to access time relations of neuronal activity independently of the amplitude of the oscillatory behavior of the resonant networks. These tools have allowed neuroscientists to detect spatial-temporal patterns of network activation to emerge from either stimuli-specific input (Laurent et al. 1996; Normann et al. 2001; Tort et al. 2010) or spontaneous firing, recurring within a scale of seconds-to-minutes, but with millisecond accuracy (Ikegaya et al. 2004). Accordingly, if an estimation of an appropriate temporal bin to account for synchronic discharges, based on the averaged synaptic delay (i.e., 5–10 ms) (Engel and Singer 2001), is thought of as a "bit" of information; the period of oscillation of a theta wave (i.e., ~100–300 ms) (Dehaene and Changeux 2011) of such conceived resonant network would represent a "word" (Dresp-Langley and Durup 2009). In fact, neuronal discharges and external stimuli phase-locked to endogenous theta activity have been shown not only to encode information (Pare et al. 2002; Pare 2003; Buzsaki 2005; Womelsdorf and Fries 2006; Paz et al. 2008; Likhtik et al. 2014) but also to facilitate plastic changes in the underlying neural networks (Greenstein et al. 1988; Pavlides et al. 1988; Hyman et al. 2003). Thus, theoretical models, such as those based on the Adaptive Resonance Theory (Grossberg 1980, 1999) predict a specific binary sequence to be associated with every brain state (Dresp-Langley and Durup 2009) if recorded from key elements within the network. Although, as argued so far, spatial-temporal patterns emerge from recordings of electrophysiological activity during stimuli induced brain states (Singer 1993, 1999, 2009); the microstimulation (μES) of a small neuronal set by binary-coded-words, using the same temporal constrains described above, has not yet been shown to be able to trigger the emergence of specific brain states. Therefore, using a discriminative fear-conditioning paradigm, we evaluated if a trained group of animals could distinguish between different μES binary-coded words (conditioned stimulus—CS); eliciting a conditioned response (CR) only in those cases in which the CS word was previously paired to a footshock (unconditioned stimulus–US). The target of μES was the basolateral amygdaloid complex; chosen not only for its important role in the neurocircuitry of the fear-conditioning paradigm (Blanchard and Blanchard 1972; LeDoux 2003), but also for its polymodal sensory integration and known capability to trigger the arousal of specific brain states (Pare et al. 2002). Finally, 2 h after the last retention test, we evaluated the number of c-Fos immunoreactive labeled (IR) neurons—within neural substrates that were more intimately involved in modulating the behavioral CRs to external stimuli: amygdaloid complex (lateral nuclei—La, central nuclei—Ce, basolateral nuclei—BLA), hypothalamus (VMH and DMD), and prefrontal cortex (IL and PrL) (Pezzone et al. 1992; Smith et al. 1992; LeDoux 2000; Hall et al. 2001; Canteras 2002; Quirk et al. 2003; Vianna et al. 2003; Holahan and White 2004; Knapska et al. 2007; Knapska and Maren 2009)—to establish the activation profiles under 3 possible conditions: (1) μES previously conditioned during training; (2) conditioned to a different μES word; and (3) animals with unpaired μES during training.

Materials and Methods

Subjects

Male Wistar rats (250–310 g) were supplied by the CEBIO-ICB-UFMG vivarium. The animals were allowed free access to food and water and were housed in temperature controlled environment under a 12 h light–dark cycle. Efforts were made to avoid any unnecessary distress to the animals and all experiments were conducted in accordance with NIH guidelines for the care and use of animals. Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees at the Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA—UFMG; Protocol no. 12/2013), in accordance with CONCEA guidelines defined by the Arouca Act 11.794 under Brazilian Federal Law.

Surgical Procedures

All animals underwent a surgical procedure for implantation of a bipolar stimulation electrode. Electrodes were made of a twisted pair of stainless-steel (0.005 in.), Teflon-coated wires (Model 791400, A-M Systems Inc., Carlsborg, WA, USA). Animals were anesthetized via systemic ketamine/xylazine combination (80 and 15 mg/kg, respectively) and locally at the scalp with lidocaine clorohydrate–epinephrine (2%) solution and then positioned in a stereotaxic frame (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Povidine–iodine solution 7.5% for veterinary use (Betadine®) was applied to the scalp for asepsis before the surgical incision. Coordinates for the right basolateral amygdaloid complex (AP = 2.8 mm posterior to bregma, ML = 5.0 mm lateral to bregma, and DV = 8.4 mm ventral to the inner table of the skull.) were derived from the Paxinos and Watson's atlas for rats (Paxinos and Watson 2009). Animals were subject to prophylactic treatment with pentabiotics (19 mg/kg) and flunixin (2.5 mg/kg) to prevent discomfort and infection after surgery. The electrode was fixed onto the skull with zinc cement and soldered to a telephone jack (Model RJ-11), which was fixed to the skull with dental acrylic.

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

The electrode placement was verified by photomicrographs of histological slices (neutral red staining- ×0.8 magnification) depicting the right basolateral amygdala complex after an electrical current (0.5 mA for 2 s) passed through the bipolar leads (Supplementary Fig. 1). Animals were observed during a 5–7 day postoperative recovery period before initiating the experimental protocol. No animals used in this study presented any signs of surgical complications.

Electrical Microstimulation

The electrical microstimulator set-up consisted of a constant-current isolation unit (Digitimer DS3-Isolated Constant-Current Stimulator) driven by a PC-programmable clocking system, which used the computer's audio output. This system delivered different patterns of temporally coded stimuli (Mesquita et al. 2011). The experiments used 3 different temporal patterns (composed of biphasic square waves, λ = 100 μs and 25 μA): 6 Hz periodic pattern (IPIs∼166.7 ms) and two binary-coded words (10 bins of 10 ms each, applied in time window of 100 ms within a total time of 1 s). In this case maintaining the same number of 6 pulses per second, considering the same parameters: biphasic, λ = 100 μs and 25 μA square waves but just temporally reorganizing the 6 pulses. These patterns were represented by a sequence of 0's (no-stimulus) and 1's (single-pulse stimulus); namely, (b.1) μES A-pattern (1001111001) and (b.2) μES B-pattern (1110000111).

Conditioning Paradigms

All conditioning paradigms were conducted during the light period of the sleep–awake cycle in 2 different contexts. Preconditioning phases and retention tests for both paradigms occurred in a 30 × 30 × 30 cm transparent acrylic box inside an isolated sound environment scented with 70% ethanol. Conditioning phases were conducted in a different room, to avoid contextual contamination, in a 23 × 23 × 25 cm gray plastic box with gridded floor and a black roof (Insight®), scented with 1% acetic acid.

For the first protocol, a classical conditioning paradigm using a 6-Hz periodic microstimulation pattern as conditioned stimuli was presented 5 times (5 trials) along a 5-s period at the beginning of each trial, applied to the right basolateral amygdaloid complex. The 5 trials were randomly distributed over the duration session (1–3 min). Animals were allowed a 5-min habituation period, once connected to the stimulation apparatus, when placed in either the preconditioning, conditioning, or retention contexts. During the preconditioning phase and retention tests, all groups underwent the same stimulation protocol, which consisted of a 6-Hz periodic pattern of microstimulation. During the conditioning phase an US (footshock, 0.4 mA) was either applied concomitant to the last 2 s of the 5 s microstimulation, paired group (n = 5), or pseudorandomly positioned in order to never overlap, within a 20 s minimum lag, to the 5-s microstimulation window, unpaired (n = 5) group (Fig. 1A,B). In a second set of experiments, animals were submitted to a discriminative fear-conditioning paradigm, also targeting the right basolateral amygdaloid complex, but the CS was one out of 2 binary-coded words: A-pattern (1001111001) and B-pattern (1110000111). Analogous to the first paradigm, all animals were plugged into the system, introduced into the contexts and allowed for a habituating period of 5 min. During preconditioning and retention tests, both binary-coded words were randomly applied as described in the previous experiment. However, during preconditioning, phase patterns (A- and B-pattern) were individually presented 5 times (10 trials) along a 5-s period at the beginning of each trial. During the conditioning phase, with regard to the unconditioned stimuli (US: 0.4 mA, during last 2 s), animals were divided into 3 distinct groups of stimulation: A-paired and B-unpaired (Red; n = 6); A-unpaired and B-paired (Blue; n = 8); A-unpaired and B-unpaired (black; n = 6). The total number of US, A-pattern or B-pattern presentations was the same (5 times each) for all groups. The criteria of the US paired and unpaired stimulation was the same used in the previous experiment. The retention test consisted of evaluating the conditioned behavior for 3 consecutive days, using only one μES pattern per day as follows: first day B-pattern, second day A-pattern, and last day B-pattern (Fig. 1A,B).

Animal movements were recorded by a video camera set up in front of the box (Supplementary movies 1 and 2). All videos were analyzed offline by a blind examiner. Freezing behavior was defined as no movements, except breathing, for a minimum of 3 s within each 5 s time epoch. Thus, the following 1 min after each μES pattern presentation, during the retention test, was divided into 12 epochs in which a freezing episode either occurred or not (Blanchard and Blanchard 1972; Fanselow and Bolles 1979; Bouton and Bolles 1980; Contarino et al. 2002; Curzon et al. 2009).

Immunofluorescence

The brains from the animals that underwent the discriminative fear-conditioning paradigm were processed for immunofluorescence triple-labeling after the third and last retention test. One and a half hours after the final B-pattern μES, animals from all 3 groups were anesthetized (Urethane 14% w/v; 10 mL/kg) and submitted to a transcardiac perfusion with cold (4°C) phosphate buffer saline (PBS) followed by paraformaldehyde in PBS (PFA, 4% w/v). The brains were removed, post-fixated in PFA and maintained at 4°C. After 24 h, brains were transferred to a sucrose-PBS solution (30% w/v) and maintained at 4°C for the next 3 days. Finally, the brains were frozen in 99% isopentane and maintained at −80°C. Forty micrometer coronal brain sections were obtained (Cryostat 300—ANCAP® Ltd) and stored at −20°C in PBS antifreeze solution [PBS (0,1 M pH 7.2); sucrose (30% w/v); ethylene glycol (30% v/v); polyvinylpyrrolidone (PVP 1% w/v)]. To determine the electrode position, a few slices were selected and stained with neutral red solution [Neutral red (1% w/v); sodium acetate anhydrous (0.3% w/v); acetic acid glacial (0.12% v/v)]. For triple-labeling immunofluorescence, sections were washed 5 times for 5 min each in PBS, incubated with glycine in PBS (0.1 M) for 20 min and then washed 3 times for 5 min each in PBS. After washing, sections were placed in a blocking solution [PBS + Triton X-100 (PBST 0.5% v/v) with normal goat serum (NGS 5% w/v) and bovine serum albumin (BSA 1% w/v)] for 1 h and then incubated with the primary antibody at room temperature for 24 h (rabbit anti-c-Fos 1:2000, Santa Cruz Biotechnology, INC.; mouse anti-NeuN 1:500, Calbiochem®). Each section was then washed 4 times for 5 min in PBS, followed by a 1 h incubation period at room temperature with the secondary antibody (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit 1:500, Molecular Probes®; Alexa Fluor® 647 goat anti-mouse 1:500, Molecular Probes®). Each section was then washed 6 times for 5 min each in PBS and incubated for 15 min with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:10000). Finally, the sections were washed 3 times for 10 min each in PBST and mounted on micro glass slides (Superfrost® Plus) embedded in aqueous nonfluorescing mounting gel (Hidromount TM).

c-fos Immunoreactive Labeling (IR) Neurons Analyses

To analyze c-fos expression the number of immunoreactive labeling neurons was counted. The microstimulation electrodes

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

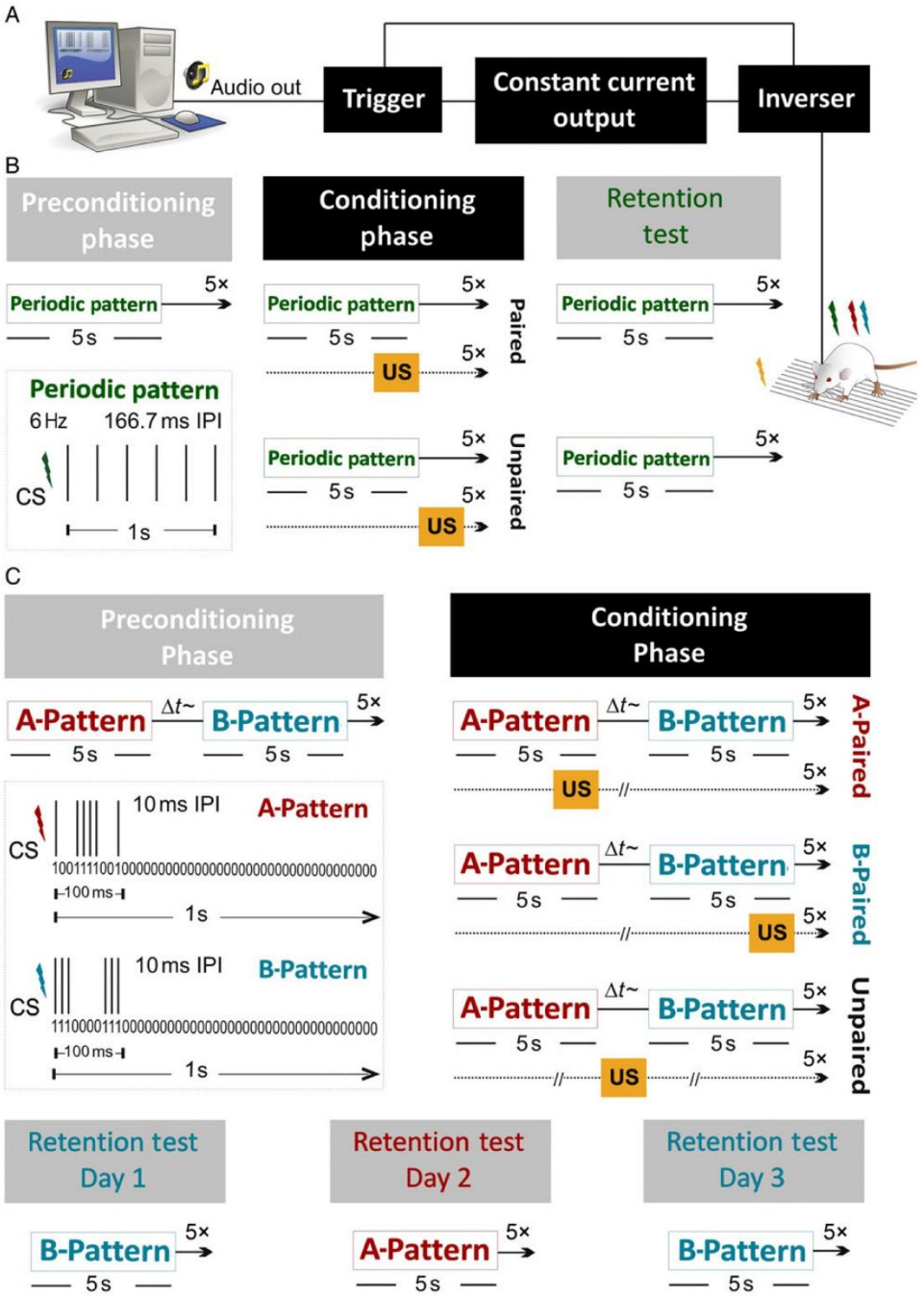


Figure 1. Experimental setup and conditioning parameters. (*A*) Experimental setup. (*B*) Classic fear-conditioning paradigm. The 6-Hz periodic pattern of microstimulation was applied 5 times randomly over the sessions, which were paired or unpaired with a footshock US during the conditioning phase. (*C*) Discriminative fear-conditioning paradigm. It was assessed if animals could discriminate between 2 μES binary-coded words: A-pattern and B-pattern. Three groups of animals were submitted to the conditioning phase under different pairing associations between the μES and the US: A-paired and B-unpaired (red); A-unpaired and B-paired (blue); A-unpaired and B-unpaired (black). Conditioned behavior was evaluated for 3 consecutive days using the same μES pattern per day; respectively, *b*—*a*—*b*.

were positioned at the right amygdaloid complex. Images were taken from the left amygdaloid complex covering the lateral and central nucleus; from the right and left amygdaloid complex basolateral nucleus and from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. Furthermore, prefrontal-cortex images were taken covering Prelimbic and Infralimbic

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

areas (3.72–3.00 mm AP). Three to 5 sections for each area were imaged and later averaged to obtain a single value per region of interest (ROI). Images were acquired on a fluorescence microscope Axio Imager.M2—Zeiss system with ×20/0.5 and ×40/0.75 objectives using Carl Zeiss Axiovision 4.8 software to create images. Exposure time was set with the same values for all data collected. For each ROI, images were separately acquired for c-Fos, NeuN, and DAPI staining using specific filters sets compatible with the excitation–emission profiles of each fluorescent dye. Raw files were processed by the z-stack method (minimum ~4 µm optical stacks collected) and mounted images were analyzed in Image-J software (http://rsbweb.nih.gov/ij/). The background auto-fluorescence was subtracted by applying the same threshold filter to all images and then the number of c-Fos/NeuN-positive staining was determined by colocalization—Image-J plugin (Costes et al. 2004). Cells were defined as particles at least 30 to 40 µm^2. Total neurons NeuN-positive staining was determined and the number of c-Fos/NeuN-positive staining was normalized to the total neurons, expressed as percentage of c-Fos/NeuN-positive staining. Finally, images were digitally merged and contrast or brightness was similarly adjusted for each best-case result showed.

Statistical Analysis

All data are presented as means ± SEM. The approximation to the normal distribution was confirmed by the Kolmogorov–Smirnov test. Statistical comparisons were made using one-way or 2-way repeated-measures analysis of variance, when appropriate followed by Bonferroni post hoc test in accordance with the coefficient of variation. For some supplementary analyses, statistical comparisons were made using χ^2 test and Kolmogorov–Smirnov test (K–S 2-sample test). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. Data were analyzed using GraphPad Prism 6.0 Software and MATLAB, The Mathworks, Natick, USA.

Results

Classical Fear-Conditioning Paradigm with a 6-Hz Periodic Microstimulation Pattern

An experimental protocol was designed to assure 2 prime aspects of the fear-conditioning paradigm (Fig. 1A,B): the µES used would not in itself induce an aversive behavioral response (neutral stimuli—NS) and that once paired with a US, the µES would then become a CS capable of eliciting a CR.

A potential setback of using the 6 Hz ES comes from the evidence that such stimuli might cause abnormal/pathological network activity. Accordingly, the 6-Hz model of epilepsy, proposed by Toman ~60 years ago (Toman 1951), has just recently regained notoriety as a possible acute animal model for drug resistant epileptic seizures (Barton et al. 2001). Nevertheless, the µES parameters used in this work were specifically chosen to avoid self-triggered abnormal behavioral outcome. First, the µES (25 µA) is a thousand times smaller than the 32 mA used in the beforementioned 6 Hz model and over 10 times smaller than other low-current ES triggered epilepsy animal models, e.g., the Electrical Kindling of the Amygdala (Racine 1972). The pulse width fixed at a 100 µs biphasic square wave is quite smaller than the 1 ms duration pulse used for seizure induction. In addition, the Electrical Kindling model uses a 60-Hz stimulation protocol for several seconds; our stimulation protocol delivers 6 pulses during 1 s, presented for only 5 times at each session. The total number of stimulation sessions was also inferior to what would be necessary to induce behavioral alterations in the kindling model. In summary, this first experimental group was designed to assure that the µES used did not promote, in itself, any behavioral outcome such as myoclonic jerks, minor twitching, freezing, or other visible motor responses.

According to the results, a 6-Hz periodic µES pattern, with constant interpulse intervals, applied to the amygdaloid complex, satisfied the before-mentioned criteria; inducing a higher CS-triggered freezing behavior only in the group in which the initial NS was paired to the US (Fig. 2A; Supplementary Movie 1) ($n = 5$ per group, $F_{1,8} = 7.415$, $^{**}P < 0.01$). In addition, there was no observable behavioral outcome from the nonpaired group after stimuli was applied.

Discriminative Fear-Conditioning Paradigm with 2 Different Binary-Coded Words

Maintaining the same number of 6 pulses per second, the next set of experiments used 2 different binary-coded words (10 bins of 10 ms each) represented here by a sequence of 0's (no-stimulus) and 1's (single-pulse stimulus): µES A-pattern(1001111001) and µES B-pattern (1110000111). Thus, 3 groups of animals were used, differing only on the choice of which µES pattern was to be paired to the US during conditioning phase (Fig. 1A,C): A-paired, B-paired, or unpaired to both patterns. Following the conditioning phase, during 3 consecutive days, the retention test consisted of presenting a daily µES pattern, for all animals, according to the following sequence: B-pattern, A-pattern, and B-pattern µES. As expected, during the preconditioning phase, neither A-pattern nor B-pattern triggered any significant aversive behavior. During the first day of retention test, when µES B-pattern was used as CS, only the B-paired group displayed a proper CR behavior. However, during the second day, when all groups were subject to the µES A-pattern, the B-paired group that increased freezing behavior the day before ceased to respond and only the A-paired group showed a proper CR behavior. At the third day of testing, groups resumed responding as they did in the first day of the retention test phase (Fig. 2B; Supplementary Fig. 2; Supplementary Movie 2). Also, the CR during the retention test was statistically different from the preconditioning phase only for the groups in which the retention test µES pattern was the same as the one paired during the conditioning phase (Fig. 2C,D; Supplementary Fig. 2). In the control group, the µES failed to induce a CR in any of the 3 consecutive retention tests (Fig. 2B; Supplementary Fig. 3). (A-paired $n = 6$; B-paired $n = 8$; Unpaired $n = 6$, $F_{8,68} = 5.572$, $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.001$; $^{***}P < 0.0001$).

The CR for all groups, during the 3 retention tests, was also quantified in terms of the probability of the first freezing event to occur within the first time epoch after stimuli presentation. Both first freezing event histogram and discrete probability distribution estimation showed statistically significant profiles (Supplementary Fig. 3) that corroborate previously shown data analysis from the last paragraph (Fig. 2B).

Profiles of Amygdaloid-Hypothalamic and Amygdaloid-Prefrontal Circuitry Based on C-Fos Immunoreactive Labeling Neurons

The hypothesis being tested by the neural activity marker protocol (c-Fos labeling) is that the µES, using a previously conditioned binary-coded word, would trigger a brain state that would, in turn, modulate the appropriate neural substrates involved in the sensory-motor integration of the fear-conditioning paradigm. Conversely, if the pattern not associated with the CR

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

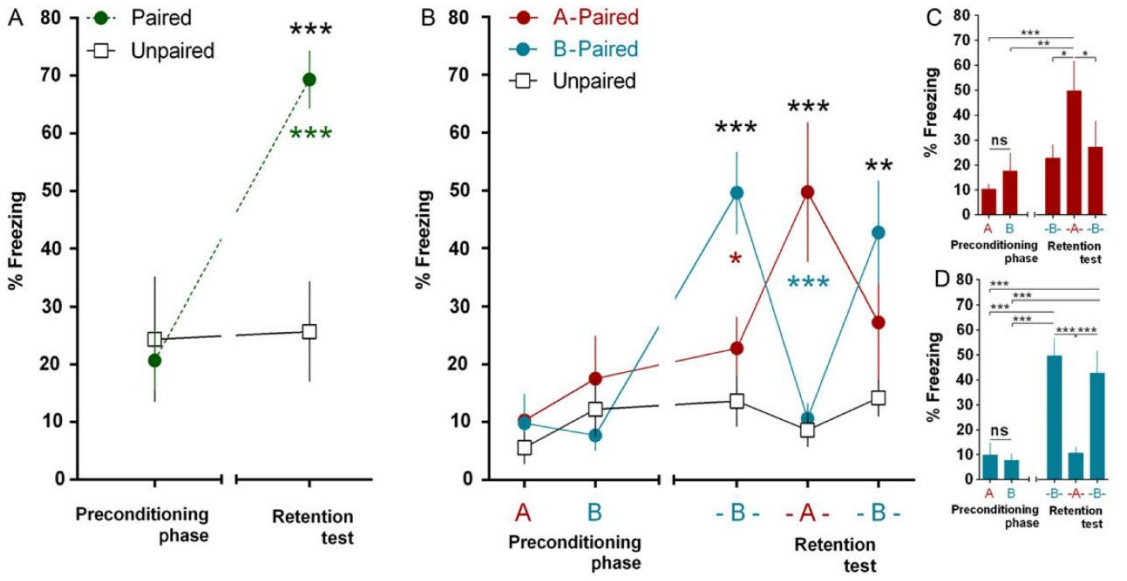


Figure 2. Evaluation of the CR to amygdaloid complex µES. (A) Classic fear-conditioning paradigm with periodic µES. Paired group showed significant freezing on retention test compared with the preconditioning phase and unpaired group ($n = 5$ per group, $F_{1,8} = 7.415$, $P < 0.026$; $^{**}P < 0.01$). (B) Discriminative fear-conditioning paradigm. A proper CR was observed on day 1 only for the B-paired group, on day 2 only for the A-paired group and resumed first day like behavior on day 3. (C,D) Paired groups showed significant freezing on the retention test when compared with the preconditioning phase and unpaired patterns (A-Paired $n = 6$; B-Paired $n = 8$; Unpaired $n = 6$, $F_{8,68} = 5.572$, $P < 0.0001$; $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$). Percentage freezing quantified during protocols as mean ± SEM.

evocation were used, one would expect the activation of brain substrates best known to be involved in modulating sensory valences and/or evaluating different contingencies. The dueling cross-modulation between prefrontal cortex and the temporal-lobe substrates has been shown to be an important factor inhibiting unsuitable responses from non-associated stimulus (Quirk et al. 2003; Likhtik et al. 2014). Thus, after the last retention test presentation with B-pattern µES, the number of c-Fos^{+}/NeuN immunoreactive labeling (IR) neurons was used to compare activation profiles of amygdaloid-hypothalamic and amygdaloid-prefrontal circuitry for all 3 animal groups. The mechanical lesion due to electrode implantation partially compromised c-Fos IR quantification of ipsilateral AMG subnuclei (Supplementary Fig. 4). The groups show very distinct patterns of c-Fos IR depending on the stimulation pattern used. The B-paired group had stronger c-Fos IR in hypothalamic (Fig. 3; Supplementary Figs 5 and 6) (A-paired, red $n = 6$; B–paired, blue $n = 7$; Unpaired, black $n = 6$. DMD, $F_{2,16} = 13.85$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. VMH, $F_{2,16} = 6.631$, $^{*}P < 0.05$), and amygdaloid subnuclei (Fig. 4*A–H*) (A-paired, red $n = 6$; B-paired, blue $n = 7$; Unpaired, black $n = 6$. La, $F_{2,16} = 5.245$. Ce, $F_{2,16} = 8.515$, $^{**}P < 0.01$. BLA, $F_{2,16} = 3.050$, $^{*}P < 0.05$) while the A-paired group favored prefrontal-cortex activation (Fig. 4*I–N*; Supplementary Figs 5 and 6) (A-paired, red $n = 6$; B-paired, blue $n = 7$; Unpaired, black $n = 6$. PrL, $F_{2,16} = 10.20$, $^{**}P < 0.01$. IL, $F_{2,16} = 8.7$, $^{**}P < 0.001$). Furthermore, there were no statistical differences between A-paired group c-Fos IR in hypothalamic nuclei when compared with the unpaired group and neither for the B-paired group c-Fos IR in prefrontal cortex when compared with the unpaired group (Figs 3 and 4).

The c-Fos IR versus freezing Pearson Correlation data depicted in Supplementary Figure 5 show a significant ($r = 0.74$, $P < 0.05$) correlation value for the DMD nuclei. The only negative correlations are from the prefrontal cortex areas (PrL, $r = -0.44$, $P = 0.11$ and IL, $r = -0.39$, $P = 0.16$); with amygdaloid (La, $r = 0.44$, $P = 0.11$; Ce $r = 0.48$, $P = 0.08$ and BLAe $r = 0.29$, $P = 0.29$) and VMH ($r = 0.31$, $P = 0.29$) areas showing positive correlation. Although the P values from PrL and IL did not reach the significance criteria convention, the fact that these were the only areas to show negative c-Fos IR versus freezing correlation corroborates Figures 3 and 4 results; thus, reinforcing our main hypothesis of differential network recruitment.

Discussion

The present results show that animals were able to distinguish between the preestablished A and B temporal patterns depending on the previous experienced paradigm to which they were subject during the conditioning phase. The behavioral data and the IR data coherently show that only the paired binary-coded word properly triggered a fear response, recruiting the amygdalo-hypothalamic circuitry involved in downstream sympathoexcitatory activation (Colpaert and Wiepkema 1976; Pezzone et al. 1992; Hall et al. 2001; de Oliveira et al. 2013). The A-paired group recruited the prefrontal cortex after B-pattern stimulation, showed unaltered hypothalamic labeling when compared with controls and did not present a significant aversive response, suggesting a brain state directed toward evaluating different contingencies (Fig. 5) (Quirk et al. 2003).

Several studies have shown that specific spatial-temporal patterns emerge within neural ensembles due to contextual or sensory stimuli (Laurent et al. 1996; Normann et al. 2001; Warren et al. 2001; Ikegaya et al. 2004). Nevertheless, most of the experimental designs have privileged a one-way street in which temporal coding is passively recorded after eliciting a specific brain state. This is the first report that has shown that a temporally coded µES, targeted at a single area, is able to differentially trigger specific circuits associated with distinct behavioral outcomes. In fact, the aversive nature of the behavioral response and neural

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

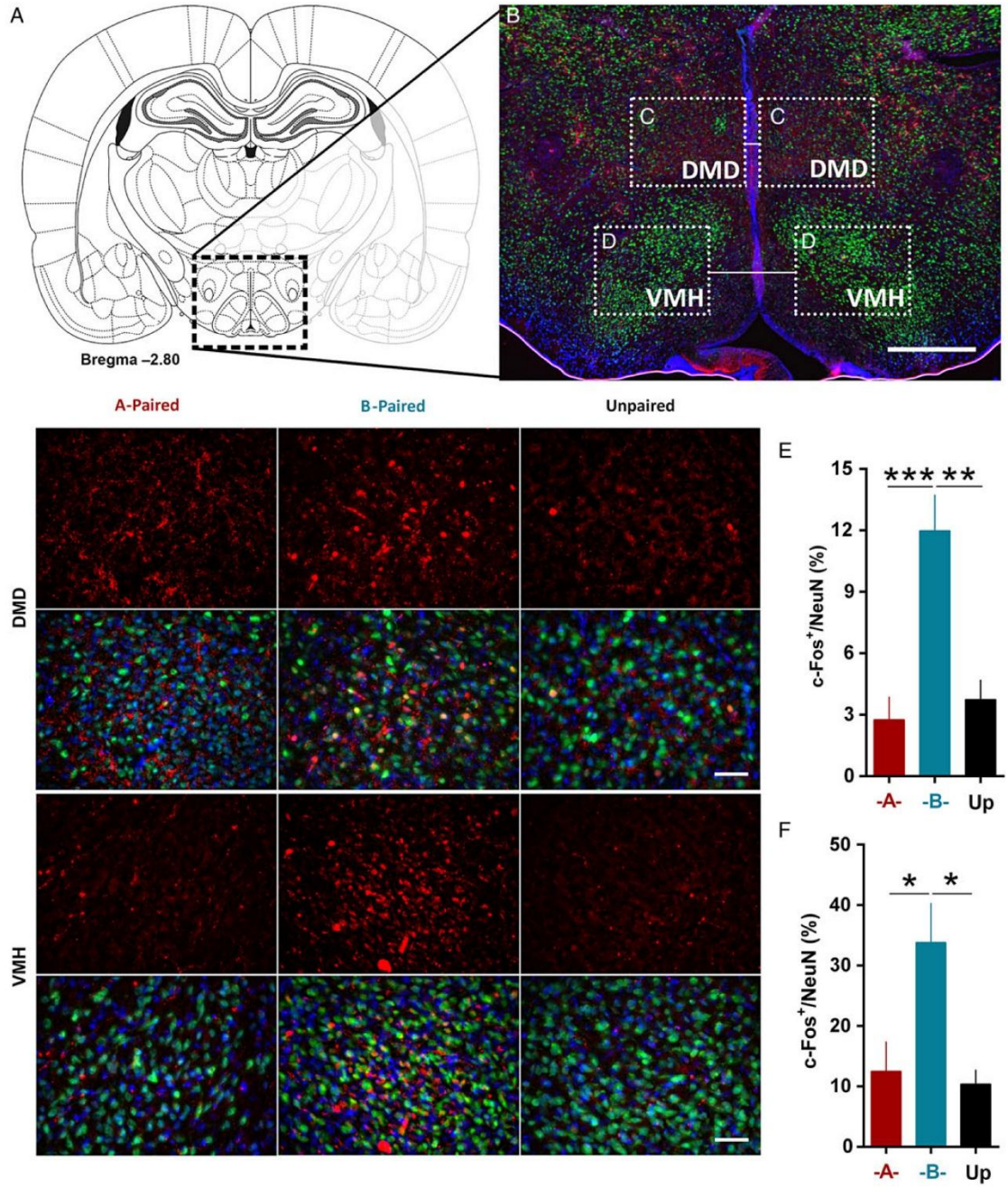


Figure 3. Hypothalamus immunoreactive triple-labeling after the last retention test presentation with B-pattern μES. (*A*) Representative diagram of the section. (*B*) Typical triple-labeling immunofluorescence (NeuN—green, c-Fos—red and DAPI—blue) showing ROIs; (*C*) Dorsomedial—DMD, (*D*) Ventromedial—VMH hypothalamic nuclei; ×5 magnification; scale bar 1 mm. Lower left panel: typical triple-labeling immunofluorescence for all groups, depicting the VMH and DMD; ×40 magnification; scale bar 100 μm. (*E*,*F*) Column graphs showing the mean number for c-Fos/neuN immunoreactive labeling (IR) neurons in each specific ROIs. The B-paired group showed significant higher c-Fos$^+$/NeuN IR when compared with the A-paired and Unpaired groups. (a-Paired $n = 6$; b-Paired $n = 7$; Unpaired $n = 6$, DMD, $F_{2,16} = 13.85$, $p = 0.003$; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. VMH, $F_{2,16} = 6.631$, $p = 0.008$; $^{*}P < 0.05$). All data presented as mean ± SEM.

ensembles recruited in the experimental paradigm were dependent on the preassociated μES temporal patterns. Other studies have used μES to force neuronal synchrony and/or temporal correlation among different neural networks in order to elicit appropriate behavioral responses (Quinkert et al. 2010; O'Doherty et al. 2012; Manzur et al. 2013; Medeiros et al. 2014). Of particular

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

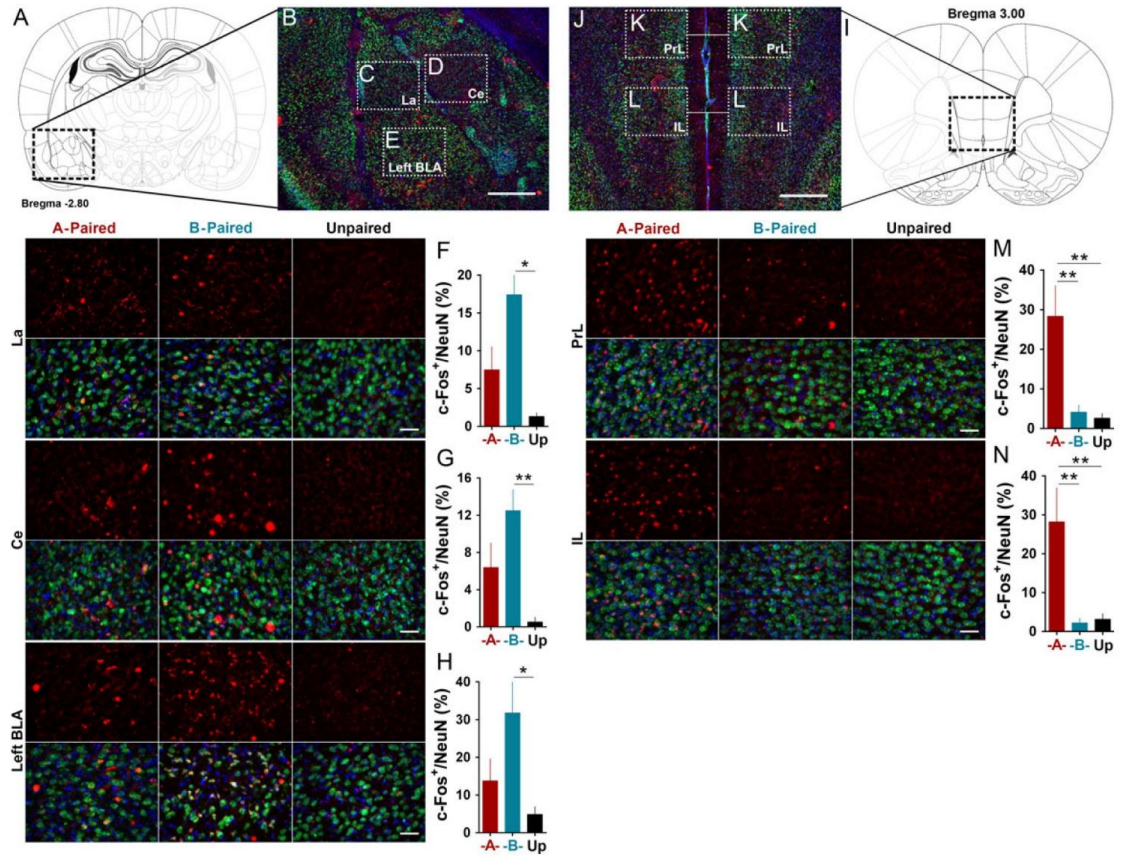


Figure 4. Amygdaloid complex and prefrontal-cortex immunoreactive triple-labeling after the last retention test presentation with B-pattern μES. (*A*,*I*) Representative diagram of the section. Typical triple-labeling immunofluorescence (NeuN—green, c-Fos—red and DAPI—blue) showing ROIs; (*B*) Amygdaloid complex: (*C*) Lateral (La), (*D*) Central (Ce), (*E*) Left basolateral (Left BLA) nuclei; (*J*) Prefrontal cortex: (*K*) Prelimbic (PrL), (*I*) Infralimbic (IL); ×5 magnification; scale bar 1 mm. Typical triple-labeling immunofluorescence for all groups, depicting the La, Ce, and left BLA (lower left panel) and the PrL and IL (lower right panel); ×40 magnification; scale bar 100 μm. Column graphs showing the mean number for c-Fos$^+$/NeuN immunoreactive labeling (IR) neurons in each specific ROIs; (*F*,*G*,*H*) B-paired group showed significant higher c-Fos$^+$/NeuN IR neurons when compared with the Unpaired group for all amygdaloid nuclei (A-Paired $n = 6$; B-Paired $n = 7$; Unpaired $n = 6$. La, $F_{2,16} = 5.245$, $P = 0.017$. Ce, $F_{2,16} = 8.515$, $p = 0.003$. BLA, $F_{2,16} = 4.466$, $P = 0.028$; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$). (*M*,*N*) A-paired group showed significant higher c-Fos$^+$/NeuN IR neurons when compared with either B-paired and Unpaired groups for all prefrontal ROIs. (A-Paired $n = 6$; B-Paired $n = 7$; Unpaired $n = 6$. PrL, $F_{2,16} = 10.20$, $P = 0.001$; $^{**}P < 0.01$. IL, $F_{2,16} = 8.7$, $P = 0.002$; $^{**}P < 0.001$). All data presented as mean ± SEM.

interest to our work, Manzur et al. (2013) have shown that specific μES synchronization features, among electrodes positioned in different brain areas, may guide an appropriate response in a behavioral discrimination task. Although the work does not apply the specific temporal pattern arrangements of μES like the ones used here, it does suggest that temporal synchronization of multi-electrode stimulation may be an unexplored new dimension for brain–machine interface feedback (Manzur et al. 2013). In addition, Quinkert et al. (2010) have shown that the temporal organization of ES has an effect on behavioral arousal and several endogenous oscillators, i.e., spectral distribution of the EEG, when applied to a polymodal associative area (Quinkert et al. 2010).

One important consideration, regarding the very nature of the temporal sequences of the A and B-word patterns, must be debated in further detail. Within a 10 bin 100 ms word, both patterns begin and end with stimuli, leaving 8 free-spots to receive 4 stimuli out of a total of 6. Thus, the combinatory arrangement of $C_{8,4}$ will give a total of 70 possible combinations to test for differences in time-coding under such framework. The first basic consideration to address is if, even in the best-case scenario of several "bit-shifts", making the temporal sequences as different as possible, the underlying neural networks are able to distinguish between different temporally coded pattern-specific stimuli. However, by choosing the A and B-word patterns with such high-enough number of "bit-shifts", the μES-words could be interpreted as having one (A-word) or 2 (B-word) high-frequency "clusters". It is pertinent to highlight the distinction between the formerly named high-frequency "clusters", composed of 3 or 4 consecutive pulses at 10-ms interpulse intervals, and a high-frequency 100 Hz stimulation burst, which usually has more than 1 s duration (>100 pulses). The known effects of high-frequency stimulation bursts may not apply to such "very short" number of stimuli, especially considering the μES settings at 25 μA. In fact, using the PTZ animal model of seizure induction, previously published work from our laboratory showed that 4 consecutive stimuli (600 μA to the amygdaloid complex) at 10 ms interpulse intervals (control group with 100 Hz

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

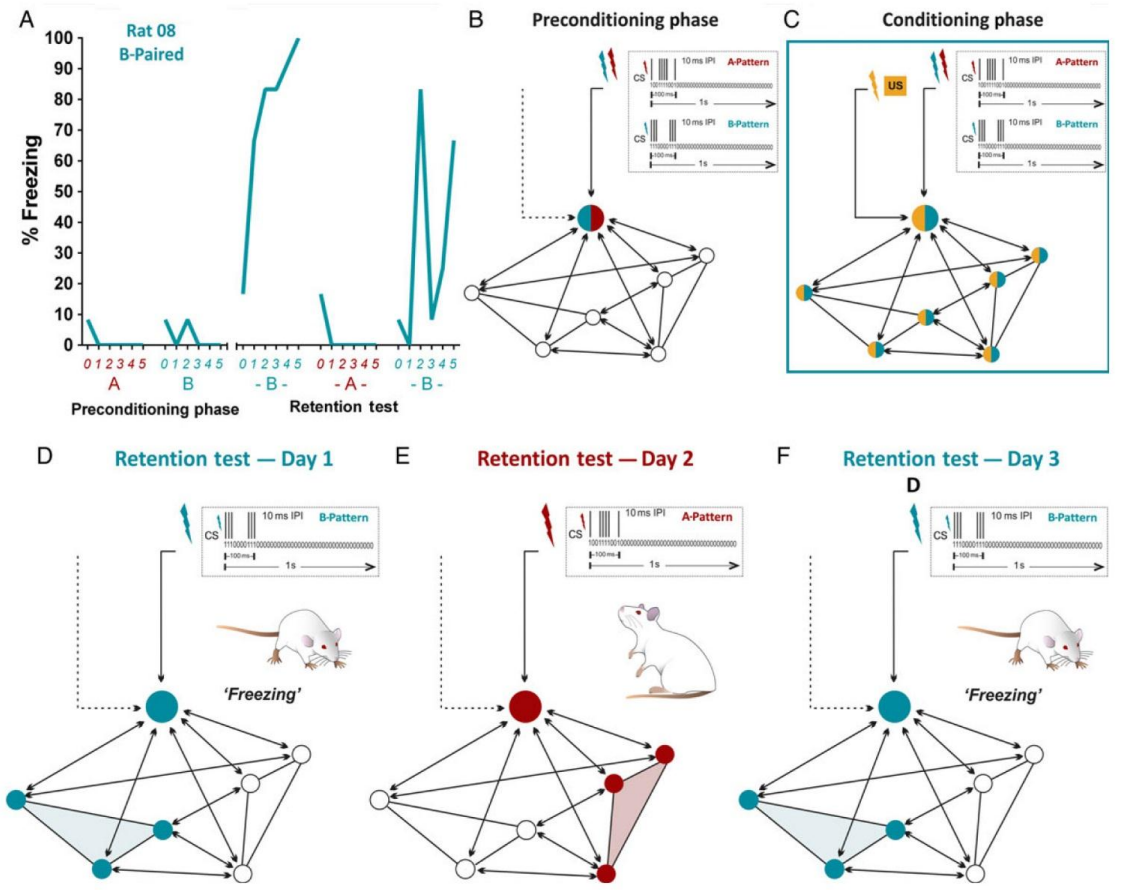


Figure 5. Discriminative fear-conditioning neural network based on adaptive resonant models. (*A*) Individual freezing responses per each trial for rat #8 showing that μES pattern-B, applied to the right basolateral amygdaloid complex, was distinguishable from μES pattern-A as evidenced by higher freezing behavior during retention test days 1 and 3. (*B*) The preconditioning phase did not elicit freezing behavior, thus no specific brain state emerged from μES. (*C*) During the conditioning phase, a specific temporal pattern (i.e., μES pattern-B) changed amygdaloid-hypothalamic reverberating networks connectivity facilitating downstream aversive response. (*D–F*) Emergence of different brain states during the discriminative protocol recruiting specific resonant networks depending on the binary-coded word previously programed during the conditioning phase (blue: amygdaloid-hypothalamic reverberation and red: amygdaloid-prefrontal-cortex reverberation).

high-frequency cluster) had no effect on ictogenesis, while periodic stimulation was proconvulsive and nonperiodic (pseudo-random) was anticonvulsive (Cota et al. 2009). This evidence strengthens the argument that the temporal reorganization of ES alone, and not the "high-frequency cluster", would have a key importance on the neural dynamics of the ictogenic process. In addition, regarding the current stimulation paradigm, if the 2 μES words presented in our work were processed by the underlying neural circuit as formed by one (A-word) or 2 (B-word) high-frequency "clusters", it would be more reasonable to expect a potentiated CR of the A-word conditioned animals when presented to a B-word during the test phase; which was not the case. Also, the B-word conditioned animals, when presented to an A-word during the test phase, should have had a less efficient CR, but still higher than nonpaired controls; also not supported by our findings (Fig. 2B; Supplementary Figs 2 and 3; Movie 2). The much more complex question that arises from such conditions, pertaining to the neurophysiology of temporal coding, is how many bit-shifts would be necessary in order to implicate in different neural processing of the stimulation patterns; this is currently under investigation.

One possible interpretation of our results is that temporally coded μES, targeted at strategic nuclei, may favor the coupling of specific network oscillators throughout the brain; thus leading to distinct behavioral outputs (Fig. 5). Our results show that the facilitated downstream activation of amygdaloid-hypothalamic connections, substrates known to be involved in the fear-response, are dependent on the temporal organization of neuronal discharge (Figs. 3 and 4; Supplementary Fig. 6). If time-independent plastic changes in synaptic modulation were the only factor involved in the associative learning paradigm, both μES patterns would have evoked similar circuitry activation. However, if the flow of the before-mentioned downstream activation were a result of plastic changes modulating the coupling of several network oscillators, only a specific pattern of μES would trigger the proper arrangement for hypothalamic recruitment. Conversely, if the pattern is not recognized, but similar to other patterns with associated emotional valence, other neural substrates should be recruited in order to properly process amygdaloidal activation, e.g., prefrontal cortex (Fig. 4*I–N*; Supplementary Fig. 6) (Likhtik et al. 2014). Several data showing the role of prefrontal cortex in learned aversive response support such a claim

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

(Quirk et al. 2003; Moscarello and LeDoux 2013). Altogether, our results show that the behavior versus network activation (c-Fos$^+$/NeuN IR results) correlation profiles are dynamically elicited by the temporal arrangement features of the μES patterns.

Nevertheless, some explanatory considerations regarding our c-Fos$^+$/NeuN IR neurons need to be made. The activity maps obtained from c-Fos labeling are dependent on a quite uniform temporal window that involves increased second-messenger signaling within the neuron (e.g., intracellular Ca^{+2}), caused by membrane depolarization and/or receptor stimulation, followed by kinase activation. The protein levels peak at roughly 30–90 min after the neurons have been recruited and accumulate inside the cell for a short period of time thereafter. In summary, the c-Fos mapping methodology most commonly used throughout literature consists of processing the tissue ~2 h after an experimental trigger is delivered (Miller et al. 1984; Knapska and Maren 2009). In addition, many researchers have investigated the neural substrates involved in the classical conditioning paradigm by employing c-Fos mapping techniques (Pezzone et al. 1992; Smith et al. 1992; Hall et al. 2001; Holahan and White 2004; Knapska et al. 2007; Knapska and Maren 2009). The correlation between c-Fos labeling and freezing is compromised not only by the dispersion of data, intrinsic to the behavioral evaluation of the conditional response, but also to the complexity of neural processing under the fear-conditioning paradigm (Supplementary Fig. 5) (Holahan and White 2004). However, the activation of specific hypothalamic nuclei directly involved in defensive behaviors (i.e., DMD) have been shown to have high correlation with freezing behavior (Canteras 2002) (Supplementary Fig. 5). On the other hand, substrates processing or modulated by learning, memory fixation, consolidation, and recovery may not have such clear-cut activation profiles to the CR behavioral marker. Accordingly, the lateral and central amygdaloidal nuclei activation may occur during both CS and US presentation, especially evident after the US, while BLA labeling is primarily attributed to CS presentation (Pezzone et al. 1992; Hall et al. 2001). Nevertheless, our results corroborate these findings once c-Fos$^+$/NeuN BLA labeling was considerably higher than lateral and central amygdaloidal nuclei activation after CS was presented (Supplementary Fig. 6). Furthermore, a potential limitation imposed by methodology is the spatial resolution of areas activated by the targeted ES. Although the bipolar stainless-steel electrodes were designed with a small exposed tip and stimulated with low intensity currents (25 μA) to increase target specificity, no further claim may be made as to whether passage fibers or other amygdaloidal subnuclei could also have been activated, thus yielding to increased variability. It is also important to highlight that different stimulation methodologies (e.g., optogenetics targeted at BLA cell bodies), considered much more specific in terms of neuronal activation, also lead to high variability in behavior outcome quantification (Stuber et al. 2012).

The c-Fos mapping of the B-Paired group may also reflect the activation of substrates involved in an on-going process of extinction (Knapska et al. 2007); considering that the group was previously stimulated, on day 1, with the same μES pattern. In fact, although Figure 2 does not characterize a typical process of memory extinction (Supplementary Fig. 3) depicting a temporally structured freezing-response analysis suggests it is present. However, since the extinction process requires the reactivation of circuits triggered by the CS in a nonreinforced session (Quirk 2002; Knapska and Maren 2009), the reverberation of circuits initiated by the temporally coded word pattern are a necessary aspect of extinction. In other words, the extinction process does not preclude reverberation of the encoded information triggered by B-Pattern μES; in fact, it is a required step for extinction. Therefore, even if the circuit activation maps reflect concomitant processes, the overall conclusion regarding the ability to distinguish between differently temporally coded μES patterns is still valid. Moreover, there were only 2 nonreinforced sessions for the B-Paired group (i.e., the A-Pattern μES day 2 retention test was not effective in eliciting a fear-expression response, thus not likely to involve neural substrates associated with the extinction process).

Our results corroborate the hypothesis that the temporal pattern of activation of a strategically positioned neuron within the network may dynamically drive the complex coupling of the myriad of oscillatory microcircuits involved in the emergence of a brain state (Fig 5). The frequency bands of LFPs have been associated with such myriad of oscillatory circuits—the lower the frequency the bigger the circuit (Rey et al. 2014)—that, in turn, may encode information by coupling/synchronizing elements of the underlying neural network among each other within specific time windows. Such temporal organization of network activity, modulating the flux of information throughout neuronal ensembles, has been proposed as a form of phase encoding (Varela et al. 2001). This premise has been experimentally observed in situations where the emergence of attentional states, although not changing the overall discharge rate of specific neurons within the ensemble, synchronized neuronal discharge to LFP oscillations at specific phase lags (Engel et al. 2001)

In summary, we concluded that a single-channel μES electrode placed at the amygdaloid complex can recruit different underlying circuits and elicit different behaviors simply by temporally reorganizing the 6 pulses within a binary-coded word. Thus, this asynchronous serial communication interface is able to trigger the emergence of different brain states depending on the binary-coded word previously programed during the training of the associative memory.

Supplementary Material

Supplementary material can be found at: http://www.cercor.oxfordjournals.org/.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (CBB-APQ-02290-13 and TEC-APQ-01084-13), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (MINCYT 0951/2013) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (476681/2012-0, 470532/2012-2 and 306767/2013-9).

Notes

We are grateful to CNPq, FAPEMIG, CAPES, and PRPq/UFMG, for financial support. *Conflict of Interest*. None declared.

References

Adrian EDAB. 1964. The basis of sensation. The action of the sense organs. New York, London: Hafner Publishing Co.

Barton ME, Klein BD, Wolf HH, White HS. 2001. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. Epilepsy Res. 47:217–227.

Blanchard DC, Blanchard RJ. 1972. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. J Comp Physiol Psychol. 81:281–290.

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

Bouton M, Bolles R. 1980. Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. Anim Learn Behav. 8:429–434.

Buzsaki G. 2005. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. Hippocampus. 15:827–840.

Buzsáki G. 2006. Rhythms of the brain. Oxford, New York: Oxford University Press.

Buzsaki G, Draguhn A. 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. Science. 304:1926–1929.

Canteras NS. 2002. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. Pharmacol Biochem Behav. 71:481–491.

Colpaert FC, Wiepkema PR. 1976. Brief communication ventromedial hypothalamus: fear conditioning and passive avoidance in rats. Physiol Behav. 16:91–95.

Contarino A, Baca L, Kennelly A, Gold LH. 2002. Automated assessment of conditioning parameters for context and cued fear in mice. Learn Mem. 9:89–96.

Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S. 2004. Automatic and quantitative measurement of protein–protein colocalization in live cells. Biophys J. 86:3993–4003.

Cota VR, Medeiros Dde C, Vilela MR, Doretto MC, Moraes MF. 2009. Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylenetetrazole seizure outcome. Epilepsy Behav. 14(Suppl 1):26–31.

Curzon P, Rustay NR, Browman KE. 2009. Cued and contextual fear conditioning for rodents. In: Buccafusco JJ, editors. Methods of behavior analysis in neuroscience. 2nd ed. Boca Raton (FL).

de Oliveira AR, Reimer AE, Reis FM, Brandao ML. 2013. Conditioned fear response is modulated by a combined action of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and dopamine activity in the basolateral amygdala. Eur Neuropsychopharmacol. 23:379–389.

Dehaene S, Changeux JP. 2011. Experimental and theoretical approaches to conscious processing. Neuron. 70:200–227.

Dresp-Langley B, Durup J. 2009. A plastic temporal brain code for conscious state generation. Neural Plast. 2009:482696.

Engel AK, Fries P, Singer W. 2001. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. Nat Rev Neurosci. 2:704–716.

Engel AK, Singer W. 2001. Temporal binding and the neural correlates of sensory awareness. Trends Cogn Sci. 5:16–25.

Fanselow MS, Bolles RC. 1979. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. J Comp Physiol Psychol. 93:736–744.

Greenstein YJ, Pavlides C, Winson J. 1988. Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity. Brain Res. 438:331–334.

Grossberg S. 1980. How does a brain build a cognitive code? Psychol Rev. 87:1–51.

Grossberg S. 1999. The link between brain learning, attention, and consciousness. Conscious Cogn. 8:1–44.

Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. 2001. Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. Eur J Neurosci. 13:1453–1458.

Heynen AJ, Bear MF. 2001. Long-term potentiation of thalamocortical transmission in the adult visual cortex in vivo. J Neurosci. 21:9801–9813.

Holahan MR, White NM. 2004. Amygdala c-Fos induction corresponds to unconditioned and conditioned aversive stimuli but not to freezing. Behav Brain Res. 152:109–120.

Hyman JM, Wyble BP, Goyal V, Rossi CA, Hasselmo ME. 2003. Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough. J Neurosci. 23:11725–11731.

Ikegaya Y, Aaron G, Cossart R, Aronov D, Lampl I, Ferster D, Yuste R. 2004. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. Science. 304:559–564.

Knapska E, Maren S. 2009. Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. Learn Mem. 16:486–493.

Knapska E, Radwanska K, Werka T, Kaczmarek L. 2007. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. Physiol Rev. 87:1113–1173.

Laurent G, Wehr M, Davidowitz H. 1996. Temporal representations of odors in an olfactory network. J Neurosci. 16: 3837–3847.

LeDoux J. 2003. The emotional brain, fear, and the amygdala. Cell Mol Neurobiol. 23:727–738.

LeDoux JE. 2000. Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci. 23:155–184.

Likhtik E, Stujenske JM, Topiwala MA, Harris AZ, Gordon JA. 2014. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. Nat Neurosci. 17:106–113.

Manzur HE, Alvarez J, Babul C, Maldonado PE. 2013. Synchronization across sensory cortical areas by electrical microstimulation is sufficient for behavioral discrimination. Cereb Cortex. 23:2976–2986.

Medeiros DC, Oliveira LB, Mourao FA, Bastos CP, Cairasco NG, Pereira GS, Mendes EM, Moraes MF. 2014. Temporal rearrangement of pre-ictal PTZ induced spike discharges by low frequency electrical stimulation to the amygdaloid complex. Brain Stimul. 7:170–178.

Mesquita MB, Medeiros Dde C, Cota VR, Richardson MP, Williams S, Moraes MF. 2011. Distinct temporal patterns of electrical stimulation influence neural recruitment during PTZ infusion: an fMRI study. Prog Biophys Mol Biol. 105: 109–118.

Mesulam MM. 1998. From sensation to cognition. Brain. 121(Pt 6):1013–1052.

Miller AD, Curran T, Verma IM. 1984. c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. Cell. 36:51–60.

Moscarello JM, LeDoux JE. 2013. Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. J Neurosci. 33:3815–3823.

Normann RA, Warren DJ, Ammermuller J, Fernandez E, Guillory S. 2001. High-resolution spatio-temporal mapping of visual pathways using multi-electrode arrays. Vision Res. 41:1261–1275.

O'Doherty JE, Lebedev MA, Ifft PJ, Zhuang KZ, Shokur S, Bleuler H, Nicolelis MA. 2011. Active tactile exploration using a brain-machine-brain interface. Nature. 479:228–231.

O'Doherty JE, Lebedev MA, Li Z, Nicolelis MA. 2012. Virtual active touch using randomly patterned intracortical microstimulation. IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng. 20:85–93.

Olds J, Milner P. 1954. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. J Comp Physiol Psychol. 47:419–427.

Pare D. 2003. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. Prog Neurobiol. 70:409–420.

Pare D, Collins DR, Pelletier JG. 2002. Amygdala oscillations and the consolidation of emotional memories. Trends Cogn Sci. 6:306–314.

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

Pavlides C, Greenstein YJ, Grudman M, Winson J. 1988. Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of theta-rhythm. Brain Res. 439:383–387.
Paxinos G, Watson C. 2009. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th ed. San Diego: Elsevier Academic Press.
Paz R, Bauer EP, Pare D. 2008. Theta synchronizes the activity of medial prefrontal neurons during learning. Learn Mem. 15:524–531.
Pezzone MA, Lee WS, Hoffman GE, Rabin BS. 1992. Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. Brain Res. 597:41–50.
Quinkert AW, Schiff ND, Pfaff DW. 2010. Temporal patterning of pulses during deep brain stimulation affects central nervous system arousal. Behav Brain Res. 214:377–385.
Quirk GJ. 2002. Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. Learn Mem. 9:402–407.
Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Pare D. 2003. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. J Neurosci. 23:8800–8807.
Quiroga RQ, Reddy L, Kreiman G, Koch C, Fried I. 2005. Invariant visual representation by single neurons in the human brain. Nature. 435:1102–1107.
Racine RJ. 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 32:281–294.
Rey HG, Fried I, Quian Quiroga R. 2014. Timing of single-neuron and local field potential responses in the human medial temporal lobe. Curr Biol. 24:299–304.
Rolls ET, Treves A. 2011. The neuronal encoding of information in the brain. Prog Neurobiol. 95:448–490.
Rumelhart DE, McClelland JL. 1986. Parallel distributed processing: explorations in the microstructure of cognition. Cambridge (MA): MIT Press.
Singer W. 2009. Distributed processing and temporal codes in neuronal networks. Cogn Neurodyn. 3:189–196.
Singer W. 1999. Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? Neuron. 24:49–65, 111–125.
Singer W. 1993. Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. Annu Rev Physiol. 55:349–374.
Smith MA, Banerjee S, Gold PW, Glowa J. 1992. Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. Brain Res. 578:135–141.
Stuber GD, Britt JP, Bonci A. 2012. Optogenetic modulation of neural circuits that underlie reward seeking. Biol Psychiatry. 71:1061–1067.
Talwar SK, Xu S, Hawley ES, Weiss SA, Moxon KA, Chapin JK. 2002. Rat navigation guided by remote control. Nature. 417:37–38.
Toman JE. 1951. Neuropharmacologic considerations in psychic seizures. Neurology. 1:444–460.
Tort AB, Komorowski R, Eichenbaum H, Kopell N. 2010. Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. J Neurophysiol. 104: 1195–1210.
Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J. 2001. The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. Nat Rev Neurosci. 2:229–239.
Vianna DM, Borelli KG, Ferreira-Netto C, Macedo CE, Brandao ML. 2003. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. Brain Res Bull. 62:179–189.
Warren DJ, Fernandez E, Normann RA. 2001. High-resolution two-dimensional spatial mapping of cat striate cortex using a 100-microelectrode array. Neuroscience. 105:19–31.
Womelsdorf T, Fries P. 2006. Neuronal coherence during selective attentional processing and sensory-motor integration. J Physiol (Paris). 100:182–193.

Downloaded from http://cercor.oxfordjournals.org/ at Universidade Federal de Minas Gerais on January 30, 2015

Brain Stimulation 7 (2014) 170–178

Contents lists available at ScienceDirect

Brain Stimulation

journal homepage: www.brainstimjrnl.com

Original Articles

Temporal Rearrangement of Pre-ictal PTZ Induced Spike Discharges by Low Frequency Electrical Stimulation to the Amygdaloid Complex

Daniel Castro Medeiros [a,b], Luciano Borges Oliveira [c], Flávio Afonso Gonçalves Mourão [a], Cristiane Perácio Bastos [a], Norberto Garcia Cairasco [d], Grace Schenatto Pereira [a], Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes [b,c], Márcio Flávio Dutra Moraes [a,b,*]

[a] Núcleo de Neurociências (NNC), Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brasil
[b] Centro de Tecnologia e Pesquisa em Magneto-Ressonância, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brasil
[c] Departamento de Engenharia Eletrônica – Escola de Engenharia – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brasil
[d] Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirao Preto, São Paulo CEP 14049-900, Brasil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 July 2013
Received in revised form 7 November 2013
Accepted 17 November 2013
Available online 9 December 2013

Keywords:
Epilepsy
Pentylenetetrazole
Low frequency electric stimulation
Phase-locking
Seizure prediction

ABSTRACT

Background: Epilepsy is a common neurological disease affecting over 40 million people worldwide. The foremost important challenge of epileptologists has been to control and predict the recurrent and spontaneous seizures of epileptic patients. The application of low frequency electrical stimulation (LFS) in deep brain structures has shown promising results in seizure control. However, the use of LFS as a probing strategy for seizure prediction, thus contributing to a closed loop solution, is still poorly explored.
Objective: To improve seizure prediction by producing gradually increasing phase-locked pre-ictal electrographical responses, due to the short-term plastic changes in epileptogenic neural networks, thus behaving as a "programmed" surrogate marker.
Methods: Urethane anesthetized rats were divided into 3 groups: the PTZ-noES group was injected with pentylenetetrazole (PTZ 4 mg/ml/min flow rate) i.v. without electrical stimulation (ES); the ES-noPTZ group received ES (0.5 Hz, 0.1 ms pulse width and 0.6 mA) to the amygdaloid complex and the PTZ + ES group received simultaneously i.v. PTZ infusion and ES. After each condition, electrographical parameters and c-Fos expression of regions of interest were evaluated.
Results: Although the PTZ + ES group had no evident change in the sustained electrographic seizure onset, duration and/or frequency spectrum; c-Fos labeling showed a different expression pattern when compared to the PTZ-noES and ES-noPTZ. Also, PTZ + ES formed a gradually increasing evoked potential; confirming the strong coupling of reverberant neural networks induced by ES – phase locked to stimuli.
Conclusion: ES induces a detectable temporal rearrangement of pre-ictal activity, which has suggestive applicability to seizure prediction.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Epilepsy is one of the most common neurological diseases worldwide [1]. Although most epileptic conditions are satisfactorily controlled by medication, about 30% of the patients are resistant to pharmacological treatment [2]. The deep-brain-electrical stimulation (DBS) is an emerging therapeutic alternative to an otherwise untreatable medical scenario. It has been hypothesized that DBS seizure control is achieved by inactivating ictogenic networks, using high-frequency stimulation, or by activating inhibitory networks, through low-frequency stimulation (LFS) [3]. If periodic LFS is applied to ictogenic areas, it may facilitate seizure occurrence [4].

Previous research has shown that 4 Hz periodic pulses applied to the amygdaloid complex (AMY) of pentylenetetrazole (PTZ) treated animals increases the susceptibility to seizure [4] and enhances neural activity in limbic system structures [5]. Adding to the complexity of the phenomena, the fixed time interval between

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interests.

* Corresponding author. Núcleo de Neurociências, Departamento de Fisiologia e Biofísica Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel.: +55 31 3409 2930; fax: +55 31 3409 2924.
E-mail addresses: mfdm@icb.ufmg.br, marcionnc@me.com (M.F.D. Moraes).

1935-861X/$ – see front matter © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2013.11.005

Epilepsy & Behavior 23 (2012) 294–297

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Epilepsy & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yebeh

Anatomically dependent anticonvulsant properties of temporally-coded electrical stimulation

Daniel de Castro Medeiros [a], Vinícius Rosa Cota [b], Maura Regina Silva da Páscoa Vilela [a], Flávio Afonso Gonçalves Mourão [a], André Ricardo Massensini [a], Márcio Flávio Dutra Moraes [a,*]

[a] Núcleo de Neurociências (NNC), Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil
[b] Laboratório de Bioengenharia, Departamento de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del Rey, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 October 2011
Revised 9 January 2012
Accepted 10 January 2012
Available online 25 February 2012

Keywords:
Epilepsy
Deep brain stimulation
Amygdaloid complex
Thalamus
Temporal patterns

ABSTRACT

In the PTZ animal model of epilepsy, electrical stimulation applied to the amygdaloid complex may result in either pro-convulsive or anticonvulsant effect, depending on the temporal pattern used (i.e. periodic-PS and non-periodic-NPS electrical stimulation). Our hypothesis is that the anatomical target is a determinant factor for the differential effect of temporally-coded patterns on seizure outcome. The threshold dose of PTZ to elicit forelimb clonus and generalized tonic–clonic seizure behavior was measured. The effect of amygdaloid complex PS on forelimb clonus threshold showed a pro-convulsive effect while NPS was anticonvulsant. NPS also significantly increased generalized tonic–clonic threshold; while PS, although at lower threshold levels, did not present statistical significance. Thalamus stimulation did not affect forelimb clonus threshold and showed similar anticonvulsant profiles for both PS and NPS on generalized tonic–clonic threshold. In summary, the anatomical target is a determinant factor on whether temporally-coded ES differentially modulates seizure outcome.

© 2012 Elsevier Inc. Open access under the Elsevier OA license.

1. Introduction

Epilepsy is characterized by recurrent and spontaneous seizures caused by hyperexcitable and hypersynchronous underlying neural networks [1]. Despite the great advances of drug development over the last decades [2], pharmacological treatment is still unable to satisfactorily control seizures in about one third to one fourth of epilepsy patients [3–5]. Intracranial electrical stimulation (ES) is emerging as a new alterative approach for the treatment of pharmacoresistant epilepsy [6].

Classically, ES is believed to work either by suppressing or inhibiting epileptogenic structures, analogous to surgical ablation (high frequency stimulation), or by activating or stimulating neural networks that would modulate seizure-like activity (low frequency stimulation) [7–9]. The careful choice of parameters such as frequency, intensity and anatomical positioning of electrodes were believed to govern the ES usage as a seizure-suppressing procedure. Nevertheless, previous results from our laboratory, using the PTZ animal model of epilepsy, showed that a fixed 4-stimuli-per-second ES, in the amygdaloid complex (AMG), could either facilitate or interfere with the behavioral manifestation of the seizure, depending on how the stimulus was temporally coded [10,11]. Thus, the frequency parameter alone cannot explain the effect of ES on the PTZ seizure outcome, opening a new venue of possibilities in order to enhance ES efficiency as a therapeutic tool against epilepsy.

However, it has not yet been evaluated if other structures, besides the AMG, may respond to time-coded electric stimulation, differentially modulating seizure activity depending on the pattern of ES used. Our hypothesis is that not every structure will be able to decode time-patterns of ES. One such alternative target to temporally-coded ES is the thalamus (TAL), already tested throughout the literature (periodic high-frequency ES only) and showing positive results in seizure suppression [12]. Although the TAL has extensive connections with forebrain and brainstem regions [13], which may explain why thalamic ES is used in the treatment of pharmacoresistant epilepsy, its function and neural architecture differ greatly from that of the AMG. The objective of this work is to test whether time-coded ES in the thalamus has the same effect as that observed for the AMG, either facilitating (periodic stimulation) or interfering (non-periodic stimulation) with the behavioral manifestation of the seizure in the PTZ animal model of epilepsy.

* Corresponding author at: Núcleo de Neurociências, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil. Fax: +55 31 3409 2924.
E-mail addresses: mfdm@ufmg.br, mfdm@icb.ufmg.br (M.F.D. Moraes).

1525-5050 © 2012 Elsevier Inc. Open access under the Elsevier OA license.
doi:10.1016/j.yebeh.2012.01.004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Márcio Flávio Dutra Moraes,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Interface cérebro-máquina: integração de um sistema sensorial artificial à resposta motora de ratos, submetido a esta comissão pelo protocolo 12 / 2013, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 15/05/2013.

Para acessar ao seu projeto clique no link:
https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/
Belo Horizonte, 16/05/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br