
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

ANDRÉ LUIZ VIEIRA LOCKMANN

**MODULAÇÃO COGNITIVA DO
PROCESSAMENTO AUDITIVO NO COLÍCULO
INFERIOR**

Belo Horizonte

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA**

ANDRÉ LUIZ VIEIRA LOCKMANN

**MODULAÇÃO COGNITIVA DO
PROCESSAMENTO AUDITIVO NO COLÍCULO
INFERIOR**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre.

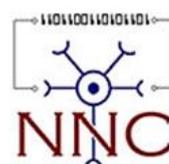
Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

**Belo Horizonte
2013**

Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Neurociências (Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais), com o auxílio das seguintes agências de fomento:

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



RESUMO

No sistema auditivo, influências cognitivas podem ser definidas como fatores intrínsecos ao observador que possibilitam que a codificação neural de sons do ambiente se modifiquem em dependência do contexto da interação sensorial e de experiências prévias. O fato de o colículo inferior (CI) receber projeções da via auditiva ascendente e de regiões cerebrais relacionadas a processamento de contextos comportamentais torna possível que o padrão de suas respostas a sons do ambiente se modifique uma vez que estes sons adquiram relevância biológica. Para avaliar tal hipótese, submeteram-se a condicionamento ao medo auditivo ratos Wistar com eletrodos implantados no CI para registro de potenciais de campo local (LFP). O grupo experimental (n=5) recebeu cinco pareamentos de estímulos condicionados (EC) auditivos (tons puros de 10 Khz com amplitude modulada a 53,71 Hz, 82 dB de intensidade e 30 s de duração) e choques na pata (400 μ A, 2s) e o grupo controle (n=5) recebeu o mesmo número de estímulos, porém explicitamente não pareados temporalmente. Avaliaram-se as respostas do CI e os percentuais de congelamento em sessões 24 h antes (pré-treino) e 24 h após (teste) o condicionamento, que consistiram de cinco apresentações do EC cada. Não houve diferença comportamental entre os grupos no pré-treino, mas o aprendizado associativo, no grupo experimental, levou ao condicionamento da resposta de congelamento à apresentação do EC no teste. As respostas do CI ao EC foram oscilações seguindo a senóide de modulação, evidenciadas na análise tempo-frequência do LFP como aumento da amplitude e da estabilidade de fase em 53, 71 Hz (potenciais evocados auditivos em regime permanente, PEArp). Os componentes espectrais amplitude e fase dos PEArp não apresentaram diferença entre os grupos no pré-treino. O aprendizado associativo no grupo experimental levou a mudanças em ambos os componentes espectrais dos PEArp. Quando os animais foram re-expostos ao EC no teste, houve um desvio da fase dos PEArp em relação ao valores anteriormente obtidos no pré-treino, mas com as repetidas apresentações do EC a fase retornou progressivamente aos seus valores do pré-treino. À medida que a fase retornava à linha de base, aumentava também progressivamente a habilidade do circuito neural em manter estes valores extremamente invariantes, em torno dos valores basais, durante o período da apresentação do EC. Este aumento de estabilidade da fase foi evidente no teste nas mesmas apresentações do EC em que houve aumento da amplitude do PEArp. Nenhuma das alterações observadas no grupo experimental ocorreu no grupo controle, sugerindo que as modificações do processamento do EC no CI se relacionam à aquisição de relevância do estímulo acústico por um processo específico de aprendizado associativo. Os resultados obtidos sugerem que o aprendizado associativo leva tanto à modificação da estrutura temporal como à amplificação da resposta do CI aos estímulos que adquirem relevância biológica. Não obstante estes dois efeitos se evidenciem no teste com dinâmicas temporais opostas, a relação causal entre eles e a possibilidade de serem reflexo de diferentes estados globais de processamento devem ser investigados em estudos posteriores.

ABSTRACT

In auditory system, top-down effects could be defined as observer's intrinsic variables which enable neural coding of sounds to be modifiable based on the context of sensory interaction and on previous experiences. Since inferior colliculus (IC) receive projections from both ascending auditory system and areas related to processing of behavioral contexts it is reasonable to figure that its patterns of activity to sounds could be modified once these sounds acquire biological relevance. To evaluate this hypothesis, Wistar rats with electrodes placed on CI to record local field potentials (LFP) were submitted to an auditory fear conditioning protocol. The experimental group (n = 5) was presented to five acoustic conditioning stimuli (CS, 10 kHz pure tone amplitude modulated at 53.71 Hz, duration of 30s and intensity of 82 dB) paired with foot shocks (400 μ A, 2s), while the control group (n=5) was presented to the same number of stimuli, although they did not coincided temporally. IC responses and percentage of freezing behavior were evaluated in sessions 24 h before (pre-conditioning) and 24 h after (test) conditioning, which consisted of five trials of CS presentation. Behavioral differentiation between groups was not significant on pre-conditioning, but, on experimental group, associative learning led to conditioning of freezing behavior to CS on test. IC response to CS was a neural oscillation following the modulation frequency, and was evident by time-frequency analysis of LFP as increases of both amplitude and phase stability at 53.71 Hz (auditory steady-state responses, ASSR). Both amplitude and phase components of ASSR were modified as an effect of associative learning. When animals were re-exposed to CS on test, phase component consistently shifted from its pre-conditioning values, on first and second CS presentations, but with repeated presentations it returned progressively to baseline values and at the fifth trial the initial shift was completely reversed. At the same time that phase returned to baseline, progressively increased the ability of the neural circuit to sustain the phase component extremely invariant, around baseline values, during the whole period of CS presentation. This enhanced phase stability was concurrent in the CS presentation sequence with the augmentation of ASSR amplitude. The effects observed on experimental group were not evident on control group, suggesting that the modifications on IC processing of CS were due to acquisition of biological relevance by the acoustic stimulus as a consequence of associative learning. The aforementioned results suggest that associative learning determines the modulation of both the temporal structure and the amplitude of neural responses of IC to sounds that acquired biological relevance. Even though these two effects are evident at different moments of test, the issue of their causal relationship and the possibility of being outcomes of distinct global patterns of sensory processing are matter for future investigations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias auditivas ascendentes no rato.....	14
Figura 2 - Corte sagital de encéfalo de <i>Rattus norvegicus</i>	15
Figura 3 – Modulação cognitiva em circuitos neurais.....	21
Figura 4 - Componentes espectrais para as senóides s_1 e s_2 de frequência f	28
Figura 5 - PEAt obtido no CI em uma janela de 100 ms.....	30
Figura 6 - Simulação de adição de senóides.....	33
Figura 7 – Cirurgia estereotáxica para implante de eletrodo no CI.....	39
Figura 8 - Tom modulado em amplitude para obtenção dos PEArp.....	40
Figura 9 – Estímulo transiente para obtenção de PEAt.....	41
Figura 10 – Desenho esquemático do protocolo de condicionamento ao medo auditivo.....	43
Figura 11 – Visualização do registro eletrofisiológico no software Kananda.	45
Figura 12 – Faixa de frequência removida para caracterização espectral do LFP. ...	50
Figura 13 - Posição dos eletrodos de registro no colículo inferior.....	53
Figura 14 – PEAt obtidos no CI.....	54
Figura 15 – Porcentagem de comportamento de congelamento durante as apresentações do EC ao longo do condicionamento ao medo.	57
Figura 16 - Registros eletrofisiológicos de um animal do grupo pareado durante o protocolo de condicionamento ao medo.....	58

Figura 17 – Composição espectral do LFP durante a apresentação do EC.....	60
Figura 18 – Composição espectral do LFP entre as apresentações do EC.	62
Figura 19 - Desvio de fase para cada apresentação do EC durante o condicionamento ao medo para os animais do grupo não-pareado.....	64
Figura 20 – Desvio de fase para cada apresentação do EC durante o condicionamento ao medo para os animais do grupo pareado..	64
Figura 21 – Evolução temporal dos desvios de fase dentro da apresentação do EC.	66
Figura 22 – Desvios de fase do PEArp ao longo do condicionamento ao medo.	69
Figura 23 – Desvios de fase do grupo pareado no teste..	71
Figura 24 – Desvios de fase do grupo não pareado no teste.	72
Figura 25 – Valores do fator de PLF de fase dos PEArp ao longo do condicionamento ao medo.	73
Figura 26 – Amplitude dos PEArp ao longo do condicionamento ao medo.	76

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> - Definição das faixas de frequência do LFP e sua correspondência com as colunas geradas no espectrograma.	49
<i>Tabela 2</i> – Porcentagem de comportamento de congelamento durante as apresentações do EC.....	56
<i>Tabela 3</i> – Desvio de fase em relação à linha de base..	68
<i>Tabela 4</i> – Valores do fator de agrupamento de fase (PLF).	73
<i>Tabela 5</i> – Amplitude dos PEArp.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	<i>Modulado em amplitude</i>
BLA	<i>Núcleo basolateral da amígdala</i>
CE	<i>Núcleo central da amígdala</i>
CI	<i>Colículo inferior</i>
CIC	<i>Núcleo central do colículo inferior</i>
DCIC	<i>Córtex dorsal do colículo inferior</i>
EC	<i>Estímulo condicionado</i>
ECIC	<i>Córtex externo do colículo inferior</i>
ENC	<i>Estímulo não condicionado</i>
EPM	<i>Erro padrão da média</i>
Fc	<i>Frequência portadora</i>
Fm	<i>Frequência moduladora</i>
FFT	<i>Transformada rápida de Fourier</i>
GABA	<i>Ácido gama-amino-butírico</i>
LA	<i>Núcleo lateral da amígdala</i>
MGB	<i>Corpo Geniculado Medial</i>
MGm	<i>Divisão medial do MGB</i>
PEAt	<i>Potencial evocado transitório</i>
PEArp	<i>Potencial evocado em regime permanente</i>
PLF	<i>Fator de agrupamento de fase</i>
RM-ANOVA	<i>Análise de variância de medidas repetidas</i>
SNC	<i>Sistema nervoso central</i>
STFT	<i>Trasnsformada de Fourier de tempo reduzido</i>

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 VIAS AUDITIVAS ASCENDENTES.....	13
1.2 MODULAÇÃO COGNITIVA DO PROCESSAMENTO SENSORIAL.....	18
1.3 ARQUITETURA SINÁPTICA DO COLÍCULO INFERIOR	21
1.4 CONDICIONAMENTO AUDITIVO AO MEDO COMO FERRAMENTA PARA ESTUDO DA MODULAÇÃO COGNITIVA NO SISTEMA AUDITIVO.	23
1.5 POTENCIAIS DE CAMPO LOCAL E POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS	26
2 JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO	35
3 OBJETIVOS DO ESTUDO	36
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 DIRETRIZES ÉTICAS NOS EXPERIMENTOS	37
4.2 SUJEITOS EXPERIMENTAIS	37
4.3 CIRURGIA	38
4.4 ESTÍMULOS AUDITIVOS.....	40
4.5 CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AVERSIVO	42
4.6 REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS	44
4.7 PROCESSAMENTO DIGITAL DOS SINAIS	46
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5 RESULTADOS	52
5.1 ANÁLISE DOS CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	52
5.1.1 POSICIONAMENTO DO ELETRODO DE REGISTRO	52
5.1.2 ANÁLISE QUALITATIVA DOS PEAT	53
5.1.3 PADRÃO COMPORTAMENTAL	55
5.2 RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	55
5.3 RESULTADOS ELETROFISIOLÓGICOS	57
5.3.1 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ESPECTRAL DOS LFPs DO CI.....	59

5.3.2 DESVIOS DE FASE SÃO EVIDENTES LOGO NA REEXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS AO ESTÍMULO CONDICIONADO NO TESTE.	61
5.3.3 O AUMENTO DO FATOR DE AGRUPAMENTO DE FASE OCORRE APÓS O DESVIO DE FASE E ACOMPANHA O RETORNO DA FASE AOS VALORES BASAIS.	70
5.3.4 O AUMENTO DA AMPLITUDE DAS RESPOSTAS EVOCADAS OCORRE SIMULTANEAMENTE AO AUMENTO DO PLF.	74
6 DISCUSSÃO	77
6.1 RESPOSTAS CONDICIONADAS COMPORTAMENTAIS	77
6.2 RESPOSTAS CONDICIONADAS ELETROFISIOLÓGICAS	79
6.2.1 ALTERAÇÕES DA COMPOSIÇÃO ESPECTRAL DO LFP	79
6.2.2 GERADORES NEURAIS DOS PEARP	81
6.2.2 OS PEARP REFLETEM PROCESSOS NÃO LINEARES NO SNC.....	82
6.2.3 DESVIOS DE FASE	84
6.2.4 AUMENTO DA RESPOSTA NEURAL AOS SONS RELEVANTES	89
6.2.5 OUTROS ESTUDOS QUE AVALIARAM PLASTICIDADE NO COLÍCULO INFERIOR APÓS O CONDICIONAMENTO AO MEDO.	93
7 REFERÊNCIAS	95
8 ANEXO I	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 VIAS AUDITIVAS ASCENDENTES

Pode-se considerar que as vias auditivas iniciam-se nas células ciliadas internas da cóclea, que promovem a transdução de oscilações mecânicas da membrana basilar em variações de seus potenciais de membrana. A membrana basilar, por sua vez apresenta diferentes propriedades mecânicas ao longo de sua extensão, o que determina uma preferência anatômica de suas oscilações a diferentes frequências dos estímulos sonoros (i.e., uma organização tonotópica). Os potenciais receptores das células ciliadas internas se propagam eletrotonicamente podendo resultar em liberação de neurotransmissores nas sinapses com os processos periféricos das células bipolares do gânglio espiral, e por sua vez, as células bipolares apresentam padrões de potenciais de ação proporcionais aos potenciais receptores (Puel, 1995). Estes potenciais de ação, a partir de então, trafegam por um circuito de neurônios em direção a estágios mais rostrais da via auditiva. Os processos centrais das células bipolares, conjuntamente com os axônios provenientes do sistema vestibular, constituem as fibras do nervo vestibulococlear, que entram no tronco encefálico na altura dos núcleos cocleares, ipsilaterais à cóclea na qual os axônios se originam. Estas fibras, que conduzem os potenciais de ação das regiões periféricas para o sistema nervoso central (SNC), se ramificam e enviam projeções que fazem sinapse nos neurônios das divisões ântero-ventral, pósterio-ventral e dorsal do núcleo coclear (ver **figura 01**). Uma parte das fibras originadas no núcleo coclear faz sinapse em neurônios do complexo olivar superior (constituído de três núcleos: oliva superior lateral, oliva superior medial e núcleo medial do corpo trapezóide) em ambos os lados do tronco encefálico. O restante das projeções do núcleo coclear passa pelo complexo olivar superior, atravessa a linha média e faz sinapse, contralateralmente, no lemnisco lateral e no colículo inferior (CI) (Malmierca, 2003). Apesar de todo este complexo sistema ascendente no tronco encefálico apresentar, até então, uma clara organização em vias paralelas, todas estas fibras necessariamente convergem e fazem sinapse no CI (Beyerl, 1978; Coleman e Clerici, 1987) (ver **figura 02** para localização do CI). Os potenciais de

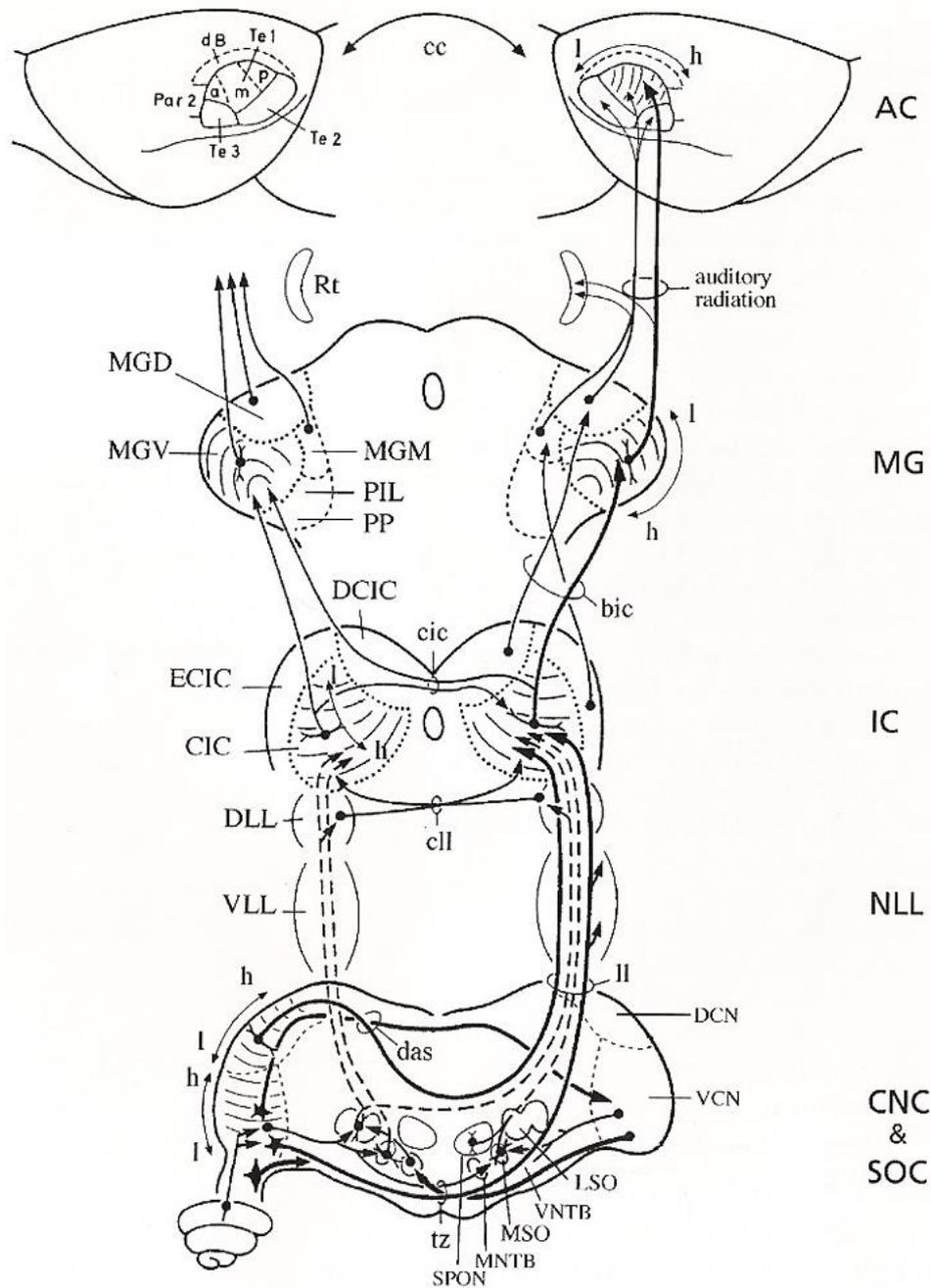


Figura 1 - Vias auditivas ascendentes no rato. Os corpos celulares representados como um círculo preto e o local em que fazem sinapses são indicados pela seta. CNC: complexo do núcleo coclear; DCN e VCN: núcleo coclear dorsal e ventral; SOC: complexo olivar superior; MSO e LSO: oliva superior medial e lateral; SPON: núcleo paraolivari superior; MNTB e VNTB: núcleo dorsal e ventral do corpo trapezoide; NLL: núcleo do lemnisco lateral; VLL e DLL: complexo ventral e dorsal do lemnisco lateral; IC: colículo inferior; CIC, ECIC e DCIC: núcleo central, córtex externo e córtex dorsal do colículo inferior; MG: corpo geniculado medial; MG, MG e MGD: divisão ventral, medial e dorsal do corpo geniculado medial; PIL: núcleo intralaminar posterior; PP: núcleo paralamina posterior; AC: córtex auditivo; Te1: área auditiva primária; Te2 e Te3: área auditiva secundária. Adaptado de Malmierca, 2003 (Malmierca, 2003).

ação do CI, portanto, em conjunto, contêm toda a informação auditiva que foi transduzida nos receptores. Os neurônios do CI primariamente projetam para neurônios no tálamo auditivo, que se constitui das divisões ventral, dorsal e medial do corpo geniculado medial, e dos núcleos paralaminares posterior e intralaminares posterior (Kudo e Niimi, 1980; Calford e Aitkin, 1983). Os neurônios do tálamo auditivo por sua vez enviam projeções predominantemente para os córtices auditivos primários (área Te1) e secundários (áreas Te2 e Te3) (Kimura, Donishi *et al.*, 2003), que então projetam para regiões associativas.



Figura 2 - Corte sagital de encéfalo de *Rattus norvegicus*, evidenciando a posição anatômica do colículo inferior (delimitado pela linha vermelha) no mesencéfalo. IC: colículo inferior. Adaptado de <http://www.anatomie-amsterdam.nl>

Tradicionalmente, postula-se que os potenciais de ação de neurônios em estágios mais caudais da via sensorial, como no tronco encefálico, codificam características específicas dos estímulos auditivos, e, à medida que se avança na hierarquia do sistema auditivo, é possível encontrar células com habilidade cada vez maior para codificar padrões espectrais e temporais complexos, de que se constituem, por exemplo, os sons encontrados em ambientes naturais e os sons usados na comunicação coespecífica. Nesse sentido, as áreas associativas são consideradas os estágios superiores na hierarquia do processamento da informação auditiva, já que são ativadas posteriormente e contêm representações polimodais, que seriam incomuns em estágios mais caudais. Estas áreas seriam também

responsáveis por todo o processamento relacionado a variáveis cognitivas, como atenção e memórias relacionadas aos estímulos auditivos (Engel, Fries *et al.*, 2001). Neste paradigma tradicional, o sistema auditivo é entendido como um conjunto de neurônios organizados em uma arquitetura serial e hierárquica, e o processamento sensorial de estímulos complexos consiste fundamentalmente de duas etapas (Naatanen e Winkler, 1999):

1. Análise: extração sequencial das características elementares dos estímulos auditivos em níveis baixos do sistema sensorial. As células nestes níveis são consideradas células simples que apresentam respostas preferenciais a parâmetros elementares dos sons, como localização espacial, frequência fundamental e intensidade.
2. Síntese: recombinação dos componentes para reconstrução da totalidade dos estímulos, em estágios altos do sistema. A reconstrução de estímulos complexos se baseia na crescente integração sináptica que se dá à medida que se avança para níveis mais altos do circuito, até que, em áreas associativas, encontram-se células que respondem especificamente a combinações espectro-temporais bastante peculiares.

Este paradigma de sistemas sensoriais claramente se baseia na seguinte premissa: o que ouvimos está já presente nos receptores, em forma simbólica, e o papel do observador no processo perceptual consiste em extrair as informações dos receptores e reorganizá-la de maneira a sintetizar *de novo* a cena auditiva, como representação do mundo externo, por meio dos padrões de atividade das células nervosas. Coloca-se então a relação entre o objeto e o observador de maneira exclusivamente instrutiva, e necessariamente exclui-se um possível papel ativo, ou construtivo, do observador na relação com o objeto no processo perceptual. Esta abordagem necessariamente traz consigo um modelo de cognição: os sistemas cognitivos agem com base em representações que são fisicamente materializadas na forma de um código simbólico no cérebro, e o comportamento adequado para uma dada situação depende da acurácia dessas representações (Varela, Thompson *et al.*, 1992). É, portanto, uma forma de organizar a cognição na sequência *entrada sensorial – decisão – resposta* (Pavlov, 1927).

Entretanto, partindo da nossa própria experiência perceptual quando interagimos em ambientes complexos, fica claro que a percepção não é determinada somente pelos estímulos externos que atingem os receptores. Na situação de uma festa cheia de convidados, por exemplo, podemos escolher a fonte sonora mais relevante e prestar atenção em uma conversa com uma pessoa específica, muito embora, outras fontes sonoras de mesma intensidade também cheguem ao nosso sistema auditivo. O problema de diferenciar fontes sonoras que se sobrepõe nos nossos ouvidos é chamado de '*problema da festa de coquetel*' (Cherry, 1953) e se refere também ao mesmo problema enfrentado para diferenciar os instrumentos quando ouvimos a gravação de uma orquestra. As nossas experiências prévias, as informações que aprendemos sobre sequências de fonemas mais prováveis, o reconhecimento de padrões pertinentes a uma voz humana específica, entre outros, modificam o processamento da informação auditiva filtrando ruídos e demais estímulos que não sejam relevantes em um determinado contexto.

Em outro tipo de situações, a informação fornecida ao sistema nervoso pelos receptores periféricos é incompleta, e o reconhecimento de objetos perceptuais depende da ação do observador em completar o padrão apresentado com base em suas experiências prévias. Um exemplo clássico é denominado restauração fonêmica, e se refere ao fato de que, em situações de ambiguidade gerada pela ausência de algumas letras nas palavras faladas, o que o observador de fato entende depende do que ele espera escutar, baseado no contexto em que as palavras são faladas e em suas experiências linguísticas prévias (Warren e Sherman, 1974; Warren, 1984). O comportamento adequado nestas situações não é resultado de uma representação precisa do ambiente, mas, ao contrário, pressupõe que o sistema cognitivo seja capaz de criar significados com base em fragmentos de informação ou que seja capaz de se destacar em variados graus do seu ambiente sensorial e selecionar, com base em seus objetivos, estados motivacionais e experiências prévias, apenas os estímulos que possuem relevância em um determinado contexto. Na literatura neurocientífica, é crescente o número de trabalhos que assumem este ponto de vista teórico de que a percepção não é o resultado da representação invariante de informações pré-determinadas do ambiente por um sistema cognitivo passivo. O conceito de **modulação cognitiva** do processamento sensorial (nos textos em inglês, usa-se o termo '*top-down*

modulation'), encontrado em alguns trabalhos, absorve precisamente este ponto de vista de que observador e o objeto determinam e condicionam um ao outro no processo perceptual.

1.2 MODULAÇÃO COGNITIVA DO PROCESSAMENTO SENSORIAL

De uma maneira geral, influências cognitivas podem ser definidas como fatores intrínsecos ao observador que determinam que o processamento sensorial possa sofrer modulação de contextos e de experiências prévias. Dentre estes fatores podem-se citar a atividade de sistemas mnemônicos, de sistemas envolvidos em estados de atenção, de fundo emocional, de preparação e de expectativa e também de sistemas que determinam definição de objetivos e planejamento de ações. Todos eles necessariamente estão ativos durante as interações do SNC com o ambiente. A atuação destas variáveis cognitivas em neurônios sensoriais pode se evidenciar como aumento das taxas de disparos neuronais a estímulos relevantes e supressão da resposta a estímulos não relevantes, o que significa uma modulação no sentido de intensificar as respostas neurais a estímulos sensoriais específicos (Engel, Fries *et al.*, 2001).

A ideia de que variáveis cognitivas possam modular o processamento sensorial vai de encontro a uma propriedade fundamental do funcionamento do SNC, que é sua habilidade em autogerar padrões de atividade espontânea em várias bandas de frequência. As oscilações endógenas refletem a atividade organizada de grupos neuronais distribuídos no SNC, mas que se encontram interconectados e podem se influenciar mutuamente. A atividade destas grandes assembleias neuronais geram padrões globais de funcionamento do SNC, que, de fato, estão relacionados a estados cognitivos específicos, e que podem 'capturar' grupos locais que a elas se conectam, modulando sua atividade (Buzsaki, 2006) (ver **figura 03**).

Não obstante estas oscilações serem geradas principalmente em regiões afastadas dos receptores sensoriais, como o sistema límbico, o lobo frontal, e os córtices associativos (Engel, Fries *et al.*, 2001; Varela, Lachaux *et al.*, 2001), o fato de existirem massivas conexões retrógradas provenientes destas áreas para todos

os níveis anatômicos do SNC, cria condições para que estes padrões possam influenciar também neurônios em estágios iniciais dos sistemas sensoriais. Com algumas raras exceções, o SNC está organizado segundo o chamado 'princípio da reciprocidade': se uma área A conecta-se com outra área B, então há também uma conexão recíproca de B para A (Varela, Lachaux *et al.*, 2001), sendo que este princípio é válido inclusive para os receptores sensoriais (Oestreicher, Wolfgang *et al.*, 2002; Doleviczenyi, Halmos *et al.*, 2005). São também vastas as conexões entre estruturas distantes, como, por exemplo, as projeções corticais ou do sistema límbico para o tronco encefálico (Gruters e Groh, 2012). Estas vias retrógradas conduzem informação sobre variáveis cognitivas, e os neurônios que recebem essas projeções, mesmo estando próximos aos receptores sensoriais, podem ser 'capturados' pelos estados globais e funcionam efetivamente de maneira adaptativa, sendo capazes de assumir diferentes estados funcionais de acordo com os diferentes contextos de processamento e determinando a maneira como se dará a interação do SNC com o ambiente (Engel, Fries *et al.*, 2001).

Esta interação entre grupos neuronais tem sido classicamente estimada por índices que refletem a consistência dos registros de campo gerado pela atividade das células nestas áreas. Este processo de acoplamento funcional entre grupos de neurônios pode ser quantificado pelo **coeficiente de correlação** entre dois sinais no domínio do tempo $x(t)$ e $y(t)$ registrados em diferentes áreas encefálicas, sendo que altos valores indicam que $x(t)$ reproduz as variações de $y(t)$ com um intervalo de tempo Δt . No caso de o coeficiente de correlação ser calculado em uma frequência específica f de interesse, o valor calculado recebe o nome de **coerência**. Há também um crescente número de evidências sugerindo que o aumento do acoplamento funcional entre áreas pode se evidenciar na análise da estrutura temporal das respostas neurais, sendo, paralelamente à alteração da taxa de disparos (ou alterações de amplitude), outro mecanismo de se efetuarem as influências cognitivas em neurônios sensoriais. Neste contexto, **sincronia** se refere à relação temporal entre os sinais $x(t)$ e $y(t)$ e é independente da amplitude. Quando representamos os sinais no domínio da frequência, os componentes de amplitude e fase aparecem como variáveis separadas e podemos considerar que a fase contém toda a informação sobre a estrutura temporal dos sinais. No caso de sinais neurais a variável de interesse é a diferença instantânea de fase entre dois sinais de áreas

diferentes em uma frequência específica. Se esta diferença, é constante durante um período de tempo T (geralmente algumas centenas de milissegundos) considera-se que houve um aumento do acoplamento entre as áreas, independentemente das variações de amplitude. Todas estas medidas refletem a consistência do sinal registrado em duas áreas do SNC e, portanto, necessitam de registros eletrofisiológicos com múltiplos eletrodos (Varela, Lachaux *et al.*, 2001).

Quando se avalia o registro obtido somente em um eletrodo, também é possível fazer inferências sobre alterações da estrutura temporal e do grau com que certa área representa estímulos sensoriais. A modificação do padrão oscilatório em diferentes bandas de frequência, principalmente nas bandas beta e gama, pode ser evidenciado claramente em registros individuais, em dependência da tarefa executada ou do contexto em que está o animal está inserido (Engel, Fries *et al.*, 2001; Buzsaki, 2006). Sabe-se, por exemplo, que em contextos aversivos, juntamente com a resposta de congelamento, aumenta significativamente a energia na banda de frequência entre 7,5 e 13,0 Hz em regiões corticais e no hipocampo, mas não no complexo amigdalóide e no núcleo caudado (Iwata e Mikuni, 1980). Sabe-se também que o condicionamento auditivo ao medo leva ao aumento de oscilações gama no córtex auditivo e também a eficácia do acoplamento dos potenciais de ação a uma fase específica dessas oscilações (Headley e Weinberger, 2013).

Quando a frequência analisada reflete a resposta de neurônios a uma estimulação sensorial periódica, a consistência da fase na frequência de estimulação, ao longo de janelas espectrais sucessivas no tempo, pode ser considerada uma medida de quão efetivamente a atividade da rede neural está sendo determinada pelo estímulo sensorial (Lopes Da Silva, 2006). Esta variável foi denominada **índice de agrupamento de fase** (PCI, do inglês *Phase Clustering Index*) (Kalitzin, Parra *et al.*, 2002; Parra, Kalitzin *et al.*, 2003) e se baseia no cálculo da variância circular do componente de fase de coeficientes complexos. O **fator de agrupamento de fase** (PLF, do inglês *Phase Locking Factor*) (Lachaux, Rodriguez *et al.*, 1999), apesar de ser comumente usado para medir a consistência de fase em sessões de estimulação distintas, pode ser usado como uma estimativa da consistência de fase ao longo do tempo, já que também se baseia no cálculo da variância circular dos componentes de fase dos coeficientes complexos.

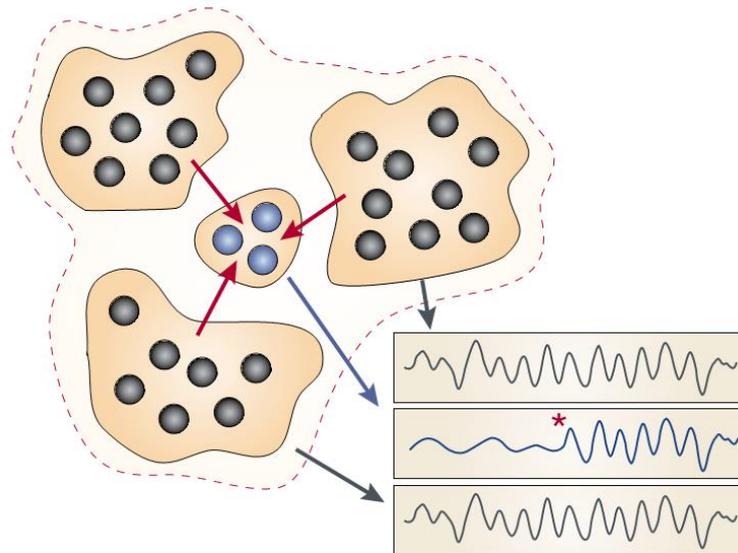


Figura 3 – Modulação cognitiva em circuitos neurais. As assembleias de neurônios (em preto), organizando temporalmente sua atividade, podem ser eficientes em influenciar o comportamento local de neurônios com os quais se conectam (em azul) e podem determinar que estes neurônios integrem-se a um estado global de funcionamento (a partir do asterisco vermelho). Adaptado de Engel e colaboradores, 2001 (Engel, Fries *et al.*, 2001).

O CI, além de constituir um estágio sináptico obrigatório para as vias auditivas ascendentes provenientes do tronco encefálico, a caminho do sistema tálamo-cortical auditivo, é também um importante alvo para projeções de outras áreas do cérebro, que conduzem informações relacionadas às variáveis cognitivas discutidas anteriormente. É, portanto, um substrato em potencial em que se poderiam observar efeitos de modulação cognitiva no processamento sensorial. Estudos *in vivo* mostraram que realmente os neurônios do CI apresentam oscilações espontâneas de seus potenciais de membrana, algumas vezes sublimiares, mas outras vezes determinando potenciais de ação mesmo na ausência de estimulação auditiva (Tortero, Pedemonte *et al.*, 1995; Ryan e Miller, 1978; Pedemonte, Tortero *et al.*, 1997).

1.3 ARQUITETURA SINÁPTICA DO COLÍCULO INFERIOR

Atualmente, já é bem estabelecido que o córtex auditivo (principalmente camada V) envia um grande número de fibras para o CI (Diamond, Jones *et al.*,

1969; Fitzpatrick e Imig, 1978; Winer, Chernock *et al.*, 2002; Adams, 1980; Bajo e King, 2012), e ao menos um estudo (Bajo e Moore, 2005) mostrou que existem mais neurônios corticais do que neurônios de núcleos auditivos do tronco encefálico que projetam para o CI. Ainda na via auditiva, o corpo geniculado medial, no tálamo auditivo, também constitui uma importante fonte de projeções para o CI (Kuwabara e Zook, 2000; Senatorov e Hu, 2002). Áreas cerebrais não relacionadas ao processamento auditivo também projetam para o CI. Os neurônios do CI recebem projeções do sistema visual, provenientes da retina (Itaya e Van Hoesen, 1982; Yamauchi e Yamadori, 1982), do córtex visual (Cooper, M. H. e Young, P. A., 1976) e do colículo superior (Coleman e Clerici, 1987; Adams, 1980; Doubell, Baron *et al.*, 2000); do sistema somatossensorial, provenientes do gânglio do nervo trigêmeo (Coleman e Clerici, 1987) e do córtex somatossensorial (Cooper, M. e Young, P., 1976); e do sistema motor, provenientes do córtex motor (Cooper, M. e Young, P., 1976).

Entretanto, no presente trabalho, deve-se enfatizar a existência de projeções provenientes de regiões que têm um papel importante em sinalizar situações de relevância biológica, como contextos comportamentais ou estados internos, já que se relacionam com o tipo de paradigma de aprendizado que adotamos como modelo (este paradigma será discutido detalhadamente na sessão referente ao condicionamento ao medo). São descritas conexões para o CI provenientes de áreas do sistema límbico, como a substância cinzenta periaquedutal (Coleman e Clerici, 1987; Adams, 1980; Larue, Prieto *et al.*, 2005), amígdala (Marsh, Fuzessery *et al.*, 2002; Hopkins e Holstege, 1978) e núcleo intralaminar do tálamo (Winer, Chernock *et al.*, 2002), além de conexões provenientes dos sistemas serotoninérgico (Hurley e Pollak, 2001; Hurley, Laura M. e Pollak, George D., 2005; Hurley, L. M. e Pollak, G. D., 2005), dopaminérgico (Herbert, Klepper *et al.*, 1997), noradrenérgico (Levitt e Moore, 1979; Klepper e Herbert, 1991) e colinérgico (Motts e Schofield, 2011; 2009). Esta arquitetura sináptica sugere que os estados funcionais dos neurônios do CI são continuamente atualizados pelas projeções originadas destes vários outros sistemas cerebrais, que estão ativos a todo o momento gerando padrões de atividade endógena referentes aos estados de atenção, de fundo emocional, de preparação e de expectativa. E sugere, também, que o padrão de resposta destes neurônios a sons do ambiente deve ser sensível a estes estados,

principalmente se estes sons adquirem relevância biológica para o animal, como acontece no condicionamento ao medo.

1.4 CONDICIONAMENTO AUDITIVO AO MEDO COMO FERRAMENTA PARA ESTUDO DA MODULAÇÃO COGNITIVA NO SISTEMA AUDITIVO.

As memórias de longo prazo relacionadas aos estímulos auditivos, sejam elas declarativas ou não declarativas, são uma importante fonte de modulação cognitiva para o processamento neural dos sons do ambiente (Engel, Fries *et al.*, 2001). Dentre os tipos de memórias não declarativas, aquelas relacionadas ao aprendizado da associação entre dois estímulos sensoriais são amplamente estudadas principalmente por contarem com um paradigma experimental de fácil execução, chamado condicionamento clássico ou pavloviano (Pavlov, 1927). O condicionamento clássico se refere a uma forma simples de aprendizado associativo no qual um estímulo inicialmente neutro, também chamado de estímulo condicionado (EC), é seguido por um estímulo de relevância biológica (podendo ter valência positiva ou negativa), chamado estímulo não condicionado (ENC) (Ledoux, 2000). O **condicionamento ao medo auditivo**, que é o modelo experimental usado neste trabalho para a avaliação de modulação cognitiva relacionada às memórias de longo prazo, refere-se a uma forma específica de condicionamento clássico, na qual estímulos acústicos neutros são pareados temporalmente com estímulos aversivos, que geralmente consiste de leves choques na pata. Após apenas um ou alguns destes pareamentos, o EC por si só pode evocar respostas defensivas (neste caso são também chamadas **respostas condicionadas**), que são respostas tipicamente evocadas pelo ENC (Ledoux, 2000; Brown, Kalish *et al.*, 1951; Bolles e Fanselow, 1980). Apesar do pequeno número de pareamentos necessários para o aprendizado, o condicionamento ao medo determina a formação de memórias bastante estáveis da associação EC-ENC (Ledoux, 2000). Neste protocolo, tradicionalmente, infere-se que houve aprendizado associativo pelo aumento do comportamento de **congelamento** ao se apresentar somente o EC após o condicionamento ao medo. O congelamento é definido como ausência total de movimentos, excetuando-se os movimentos respiratórios (Grossen e Kelley, 1972;

Curti, 1942; Fanselow e Bolles, 1979; Fanselow, 1984). Outras respostas condicionadas descritas são alterações autonômicas (e.g. aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial), alterações endócrinas (e.g. liberação cortisol e catecolaminas) e alterações na sensibilidade a dor e na expressão de reflexos (e.g. potenciação do sobressalto) (Ledoux, 2000).

Já é bem estabelecido que o aprendizado associativo decorrente do condicionamento ao medo auditivo se deva a uma série de alterações plásticas em regiões específicas do SNC. Acredita-se que estes eventos plásticos dependam em um primeiro momento da convergência de sinapses que contêm informações relativas ao EC e ao ENC (Ledoux, 2000).

Esta convergência ocorre em neurônios da amígdala lateral (LA) (Ledoux, 2000), que recebe projeções nociceptivas e auditivas por vias talâmica e cortical (Ledoux, Farb *et al.*, 1990; Romanski e Ledoux, 1993; McDonald, 1998; Ledoux, Cicchetti *et al.*, 1990). Esta área, de fato, apresenta aumento de responsividade ao EC após o condicionamento, e apesar de esta alteração plástica poder ser mediada por ambas as vias acústicas (Romanski e Ledoux, 1992), estudos com registros multiunitários mostraram que a plasticidade da resposta de latências curtas (via tálamo-amígdala) em LA antecede a plasticidade na resposta de latências maiores (via córtex-amígdala) (Quirk, Armony *et al.*, 1997; Quirk, Repp *et al.*, 1995). A plasticidade resultante de LA é enviada, por via da amígdala basolateral (BLA), à amígdala central (CE), que funciona como o núcleo de saída do complexo amigdalóide. As projeções de CE para o tronco encefálico e para o hipotálamo são determinantes para a expressão das respostas condicionadas citadas anteriormente (Ledoux, Iwata *et al.*, 1988).

Na divisão medial do MGB (MGm), também ocorre convergência de EC e ENC, e não só MGm, mas também as outras duas divisões do MGB apresentam aumento da resposta evocada pelo EC após o condicionamento ao medo auditivo (Edeline e Weinberger, 1991a; b; 1992). Como MGm constitui a principal fonte de projeções para a LA (Wepic, 1966; Lund e Webster, 1967), as alterações plásticas observadas em LA, em parte, refletem a plasticidade em MGm, apesar de que a amígdala também seja importante para a potenciação da resposta talâmica, já que o

bloqueio do complexo amigdalóide impede a expressão de alterações plásticas em MGB (Maren, Yap *et al.*, 2001).

Adicionalmente, os córtices auditivos também apresentam aumento na responsividade ao EC em decorrência do condicionamento ao medo (Galvan, Chen *et al.*, 2001; Galván e Weinberger, 2002; Weinberger, Javid *et al.*, 1993), embora a plasticidade cortical ocorra somente após o surgimento de alterações plásticas na amígdala (Quirk, Armony *et al.*, 1997) e a expressão de respostas condicionadas simples ocorra normalmente em animais descorticados (Romanski e Ledoux, 1992). O sistema colinérgico, que recebe inervação de CE, tem papel fundamental no desenvolvimento da plasticidade no córtex auditivo, já que a injeção de antagonistas de receptores muscarínicos nestas regiões corticais impede o desenvolvimento de alterações plásticas após o condicionamento (Ji e Suga, 2009). A noradrenalina (Manunta e Edeline, 1999; 1997), a serotonina (Stark e Scheich, 1997; Juckel, Hegerl *et al.*, 1999) e a dopamina (Bao, Chan *et al.*, 2001) também são neuromoduladores importantes no desenvolvimento de plasticidade do córtex auditivo no condicionamento ao medo, alterando as curvas de sintonia e aumentando a responsividade dos neurônios destas regiões ao EC.

Nos estudos citados até aqui, consideraram-se como alterações plásticas apenas aumentos na responsividade dos neurônios ao EC. No entanto, como colocado anteriormente, os efeitos cognitivos podem se dar pela modificação da estrutura temporal da atividade de neurônios sensoriais. Poucos estudos até então avaliaram alterações de temporização como efeito do condicionamento ao medo. Sabe-se que as respostas do córtex auditivo a estímulos auditivos envolve a geração de oscilação na banda gama do LFP cerca de 100 milissegundos após o início do estímulo. Em protocolos de condicionamento ao medo, aquisição da plasticidade cortical para o EC tem forte correlação com a intensidade desta oscilação gama induzida pelo EC no dia do treino (Headley e Weinberger, 2011). Além disso, um dos efeitos do condicionamento é o aumento da sincronização dos disparos do córtex auditivo com as oscilações gama do LFP (Headley e Weinberger, 2013). A amígdala também apresenta alterações na temporização de suas respostas durante o condicionamento (Popescu, Popa *et al.*, 2009; Bauer, Paz *et al.*, 2007).

Todas estas áreas associativas, auditivas e sistemas neuromoduladores que sofrem alterações plásticas no condicionamento ao medo auditivo, sejam alterações da taxa de disparo dos neurônios ou da sua estrutura temporal, enviam projeções para neurônios do CI, justificando a hipótese de que também nos neurônios do CI possam se encontrar alterações plásticas. Como a integração destas várias projeções tem efeito nos neurônios do CI na forma de variações de potenciais pós-sinápticos, supralimiais ou sublimiais, a implantação de microelétrodos para registro da atividade elétrica referente a estes fenômenos constitui uma importante ferramenta para o estudo da modulação cognitiva no CI.

1.5 POTENCIAIS DE CAMPO LOCAL E POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS

Os movimentos de carga decorrentes da atividade dos neurônios geram potenciais elétricos que podem ser registrados por microelétrodos posicionados no espaço extracelular (Logothetis, 2003), próximo a grupos celulares de interesse. Estes potenciais, medidos em Volts com relação a outro potencial elétrico de referência (geralmente registrado por eletrodo em uma região encefálica afastada da região de interesse), podem ser monitorados com a resolução temporal de microssegundos e constituem uma solução razoável ao problema inverso do eletroencefalograma, já que os registros representam a atividade de populações neuronais em um raio de 0,5-3,0 mm da ponta do eletrodo (esta resolução espacial é aproximada para microelétrodos com diâmetro da ponta de registro em torno de 100 μm e impedância de aproximadamente 40-120 $\text{k}\Omega$, considerando que o potencial elétrico gerado em um ponto no espaço decai com o quadrado da distância) (Mitzdorf, 1987).

Dois tipos de sinais podem ser obtidos destes registros extracelulares, com base em uma separação por bandas de frequência. Um filtro passa alta com frequência de corte entre 300-400 Hz é comumente usado para se isolarem disparos multiunitários, ao passo que um filtro passa baixa em torno de 300 Hz (ou mesmo nenhum filtro para altas frequências, quando o interesse são as oscilações de alta frequência, acima de 90 Hz (Buzsáki e Silva, 2012) é comumente usado para se

obterem **potenciais de campo local (LFP, do inglês *Local Field Potential*)** (Logothetis, 2003).

Apesar de, tradicionalmente, os trabalhos de neurofisiologia de sistemas sensoriais terem se baseado em registros multiunitários, no caso do presente trabalho, o LFPs constituem uma ferramenta em potencial para estudar os fenômenos de integração sináptica no CI, dada a natureza dos eventos celulares que os geram. Os LFPs podem ser considerados predominantemente como resultado de correntes sinápticas nos dendritos e no soma das populações neuronais próximas à ponta do eletrodo de registro (Logothetis, 2003; Mitzdorf, 1985). Uma contribuição menor à composição destes sinais provém de eventos celulares não sinápticos, como por exemplo, potenciais de ação mediados por correntes de Ca^{++} e Na^+ , pós-potenciais de disparos somato-dendríticos (Gustafsson, 1984) e oscilações de membrana dependentes de voltagem (Kamondi, Acsady *et al.*, 1998). Dessa forma, a informação contida no LFP do CI reflete processos integrativos sublimiares que não são evidentes nos registros multiunitários e que podem ser o reflexo de influências de estados globais, responsáveis pela modulação cognitiva do funcionamento destes neurônios.

Os LFPs, sendo sinais que representam variações de potencial em função do tempo, podem ser modelados como uma série de ondas senoidais, definidas em termos de seus componentes espectrais: período, amplitude e fase (ver **figura 04**). Estes sinais podem ser avaliados no domínio da frequência, por meio de análises tempo-frequência, que são técnicas matemáticas usadas para estimar os componentes espectrais de um sinal (Varela, Lachaux *et al.*, 2001). Dentre as análises tempo-frequência, uma técnica bastante utilizada é a transformada de Fourier, que produz representações complexas $X(f)$ do LFP. $X(f)$ é constituído de um componente real $Re[X(f)]$ e um componente imaginário $Im[X(f)]$ para cada frequência do espectro. Estes componentes podem ser representados no plano cartesiano, no qual o eixo x representa $Re[X(f)]$ e o eixo y representa $Im[X(f)]$.

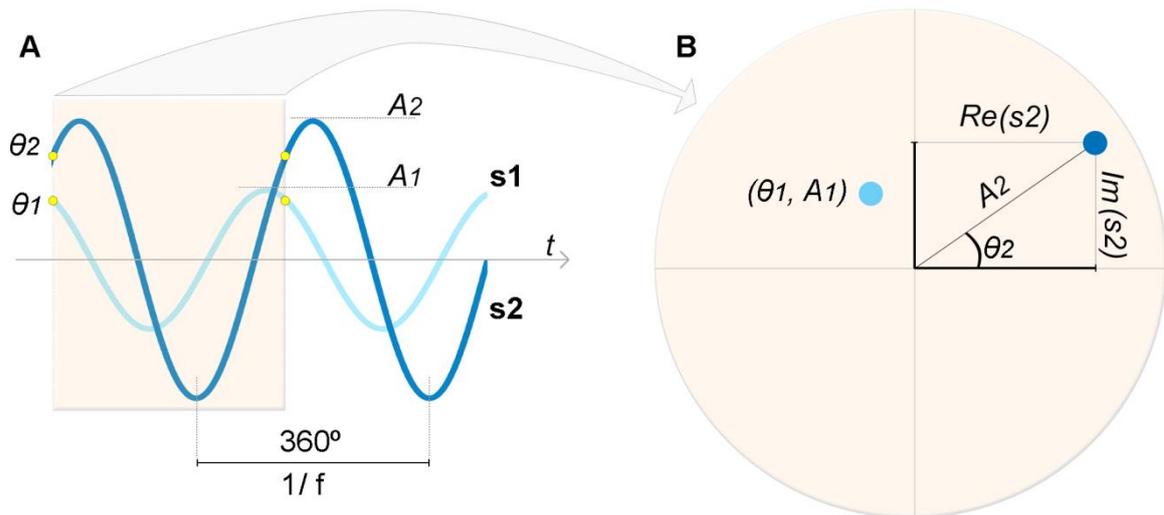


Figura 4 - Componentes espectrais para as senóides s_1 e s_2 de frequência f . A. Representação no domínio do tempo. O período ($1/f$) é o tempo gasto para se completar um ciclo inteiro. A amplitude (A) se refere ao tamanho dos picos das ondas senoidais. A fase (θ), destacada pelos círculos amarelos, se refere à fração do ciclo que está deslocado em relação a um ponto arbitrário. As senóides s_1 e s_2 têm a mesma frequência f , mas A e θ diferentes. B. Representação de s_1 e s_2 (janela temporal selecionada em A) em gráfico polar pelas coordenadas polares A e θ . As senóides podem ser também representadas por meio de coordenadas cartesianas Im e Re .

A partir desta representação cartesiana, amplitude $A(f)$ e fase $\theta(f)$ podem ser obtidas por simples relações trigonométricas e podem ser descritas por meio de coordenadas polares.

$$A(f) = \sqrt{Re[X(f)]^2 + Im[X(f)]^2}$$

$$\theta(f) = \tan^{-1} \left(\frac{Im[X(f)]}{Re[X(f)]} \right)$$

Utilizando-se de coordenadas polares, os componentes de um sinal S no domínio da frequência (em que f são os componentes de frequência) pode ser descrito de acordo com a expressão:

$$S(f) = A(f) \cdot e^{i\theta(f)}$$

Quando os LFPs são registrados durante a apresentação de estímulos auditivos, os sinais registrados podem ser denominados **potenciais evocados auditivos (PEA)**.

Se são usados estímulos acústicos de curta duração (em torno de 10 a 50 ms), com início abrupto e repetidos a intervalos relativamente longos (tipicamente a cada 0,3 – 1,5 segundos) as respostas neurais recebem a denominação **potenciais evocados auditivos transitórios (PEAt)**. Estes parâmetros de estimulação são essenciais para obtenção de uma boa relação sinal/ruído, já que a curta duração e o início súbito permitem a ativação sincronizada da população neuronal em um curto período de tempo, e os longos intervalos entre os estímulos permitem que a rede neuronal retorne ao seu estado basal antes da apresentação do próximo estímulo. Para obtenção dos PEAt, os estímulos utilizados são geralmente cliques, que são sons gerados pela reprodução de uma onda quadrada; ou ‘tone bursts’, que são trechos curtos de tons puros. A obtenção dos PEAt envolve realização de médias em um grande número de janelas temporais do LFP sincronizadas com os estímulos acústicos. Como resultado, a atividade aleatória do LFP se cancela e aproxima-se de zero, e uma série de deflexões positivas e negativas, caracterizadas por suas amplitudes e latências, se tornam evidentes após este processo (Dawson, 1954; 1947). Quando os PEAt são obtidos de registros de LFP do CI, estas deflexões já são bem caracterizadas: um primeiro pico positivo entre 5-8 ms após a apresentação do som, seguido de uma proeminente negatividade em torno de 9-12 ms (Meeren, Van Cappellen Van Walsum *et al.*, 2001) (ver **figura 05**). Acredita-se que os componentes dos PEAt refletem picos momentâneos de atividade de grupos neuronais relacionados ao processamento do estímulo, e que esta atividade evocada aparece adicionada à atividade neuronal de fundo, considerada como um ‘ruído’ com distribuições de amplitude e fase não relacionadas ao processamento do estímulo (Makeig, Debener *et al.*, 2004).

Embora grandes avanços no entendimento da fisiologia do sistema auditivo tenham sido conseguidos com registros PEAt, esta abordagem tem limitações intrínsecas para a investigação de processos relacionados à modulação cognitiva do processamento auditivo. Uma limitação importante é que os estímulos acústicos transientes são salientes em relação à totalidade do ambiente acústico, de modo que alocam automaticamente a atenção durante sua apresentação. Isto torna difícil

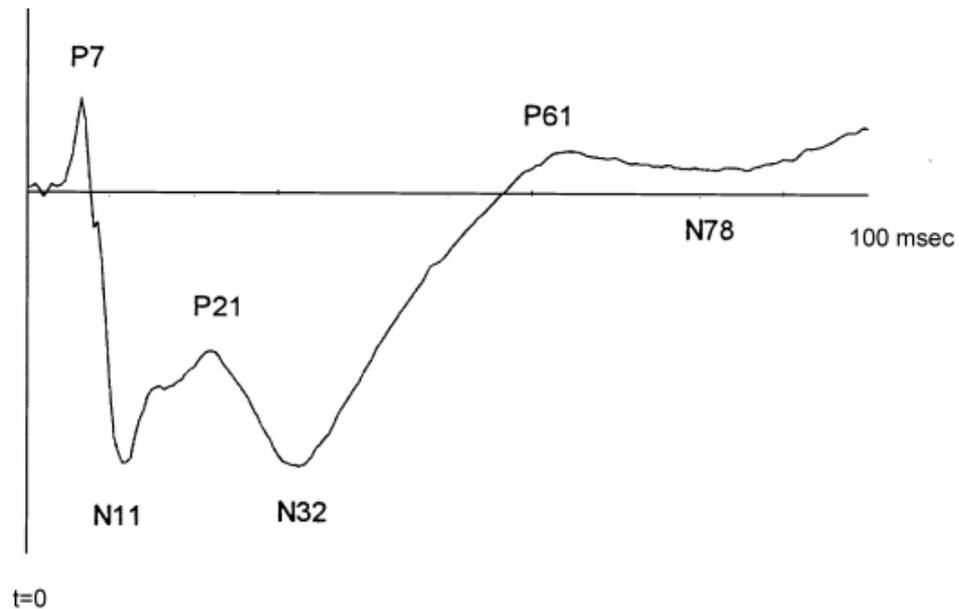


Figura 05 - PEAt obtido no CI em uma janela de 100 ms. No caso de o LFP ser registrado no CI, os componentes dos PEAt consistem de um primeiro pico positivo surge entre 5-8 ms após a apresentação do som, seguido de uma proeminente negatividade em torno de 9-12 ms. Modificado de Meeren, 2001 (Meeren, Van Cappellen Van Walsum *et al.*, 2001).

a eliminação de efeitos da saliência de estímulo em experimentos desenhados para avaliar-se especificamente a modulação cognitiva nas respostas neurais. (Yantis e Jonides, 1990; Schreij, Owens *et al.*, 2008) Adicionalmente, a obtenção das respostas por meio da realização de médias de uma sequência de eventos elimina a possibilidade de avaliação da evolução do padrão da resposta ao longo das diferentes apresentações do som. Um ponto negativo desta forma de processamento é a perda de informação no caso de haver pequenas flutuações temporais na resposta evocada. O erro referente à flutuação de fase se torna progressivamente mais preocupante quanto mais rostral for feito o registro. Por fim, se considerarmos a escala temporal dos eventos cognitivos, que está em torno de centenas de milissegundos (Varela, Lachaux *et al.*, 2001), é razoável supor que as deflexões nos primeiros milissegundos do PEAt não reflitam ainda uma possível modulação cognitiva sobre o processamento sensorial.

Idealmente, a avaliação da modulação cognitiva nos sistemas sensoriais deve contar com estímulos auditivos de inícios suaves e de longa duração, que são continuamente presentes no ambiente acústico, sem alterações abruptas no seu

padrão. Tons puros modulados em amplitude (tons AM) apresentam todas estas características e têm sido sugeridos como uma forma de estimulação mais fisiológica que os estímulos transientes. Tons AM são resultado da multiplicação de duas ondas senoidais: uma senóide de alta frequência (f_c), que é denominada **portadora** e determina qual região da membrana basilar será ativada; e uma senóide de baixa frequência (f_m), que é denominada **moduladora** e determina a taxa de variação de amplitude de f_c . As respostas a estes estímulos são oscilações neurais que seguem a frequência de modulação, podendo ser evidenciadas nas análises tempo-frequência do LFP como um aumento da amplitude e da estabilidade de fase em f_m durante a apresentação do som (Rees, Green *et al.*, 1986; Kuwada, Batra *et al.*, 1986). Estas respostas neurais são denominadas de **potenciais evocados auditivos em regime permanente (PEArp)**. Os PEARp refletem a ativação da via auditiva por períodos de tempo prolongados em um ambiente acústico estável, em que o efeito de saliência é minimizado. Como a detecção das PEARp não depende da realização de médias de eventos permite a comparação do estado da rede neural ao longo de uma sequência de apresentações de estímulos e mesmo ao longo de uma mesma apresentação do som.

O fato de as oscilações das PEARp se evidenciarem especificamente em f_m faz com que os componentes espectrais (amplitude e fase) desta frequência, dentro da análise tempo-frequência, sejam uma assinatura eletrográfica da atividade dos grupos neuronais do CI envolvidos diretamente no processamento do estímulo auditivo. Em última análise, as oscilações em f_m , refletem o balanço da integração sináptica no CI de projeções que também oscilam em f_m , sejam elas provenientes de vias ascendentes do tronco encefálico ou de vias descendentes. Além disso, o fato de que algumas áreas sensoriais primárias visuais, auditivas e olfativas sabidamente apresentam respostas oscilatórias não lineares a estímulos sensoriais sugerem que estas oscilações possivelmente possam ter um papel mecânico no processamento sensorial, possivelmente constituindo-se como uma forma de codificação contida na estrutura temporal das respostas neuronais. Como já mencionado, a sincronização de oscilações em diversas bandas de frequência têm sido sugeridas como mecanismo, ou ao menos indício, de integração entre grupos neuronais. Uma característica importante destas oscilações endógenas é que, ao contrário de f_m , elas não se encontram sincronizadas em fase com os estímulos

sensoriais, e, portanto a realização de médias de janelas temporais leva a uma atenuação destas oscilações no sinal final com perda de informação. Portanto, a possibilidade da avaliação do fluxo primário de informação sensorial em f_m , simultaneamente à avaliação do de oscilações endógenas nas bandas de frequência adjacentes, constitui um importante refinamento no estudo da dinâmica de circuitos neurais por meio de análises tempo-frequência e uso de PEARp.

De acordo com a concepção de modulação cognitiva que se propõe neste trabalho, alguns trabalhos fornecem indícios consistentes de que respostas oscilatórias nos PEARp refletem uma interação entre osciladores induzidos por estímulo e osciladores endógenos. Sabe-se que a amplitude e a fase dos PEARp evoluem gradativamente durante os primeiros 200 milissegundos antes de atingir um estado estável (Ross, Picton *et al.*, 2002). Estas oscilações podem ser perturbadas por um ruído abrupto de apenas alguns milissegundos, e, no entanto, após a perturbação, os PEARp levam novamente cerca de 200 ms para atingir seus valores estáveis (Ross, Herdman *et al.*, 2005). Estes resultados colocam os PEARp como um correlato eletrofisiológico da integração temporal que ocorre no sistema auditivo (Bregman, 1994; Bregman, 2005), e que depende da estabilidade do estímulo em uma escala temporal em torno de centenas de milissegundos (Varela, Lachaux *et al.*, 2001). Por fim, outro grupo de resultados mais diretos mostra que a amplitude dos PEARp pode ser voluntariamente modulada pela atenção seletiva do observador (Ross, Picton *et al.*, 2004; Bidet-Caulet, Fischer *et al.*, 2007; Skosnik, Krishnan *et al.*, 2007; Müller, Schlee *et al.*, 2009) e que seu componente de fase apresenta desvios como resultado de aprendizado de tarefas envolvendo o estímulo auditivo (Gander, Bosnyak *et al.*, 2010).

Sabe-se que as respostas corticais a estímulos sensoriais podem ter, por exemplo, a estrutura temporal de uma oscilação gama, e quando se usa um estímulo periódico na mesma frequência adiciona-se um segundo oscilador ao sinal registrado. Nestes trabalhos em que se propõe uma interação entre osciladores endógenos e induzidos por estímulo, o que pode estar ocorrendo é uma somação espacial de dois osciladores na mesma frequência, induzido e endógeno, captada pelo eletrodo de EEG. Outra possibilidade ainda é que a resposta de outros circuitos de retroalimentação, que também oscilam na frequência da estimulação periódica, possam se tornar evidentes assim que a rede neural atinja uma ativação em regime

permanente. Independentemente da origem do oscilador, é certo que alterações de fase certamente significam que houve adição de outro oscilador, na mesma frequência e com fase diferente, no sinal registrado (o que não necessariamente significa adição no nível sináptico). Além disso, alterações nas bandas de frequência vizinhas não têm efeito algum na fase de um oscilador (ver **figura 06**).

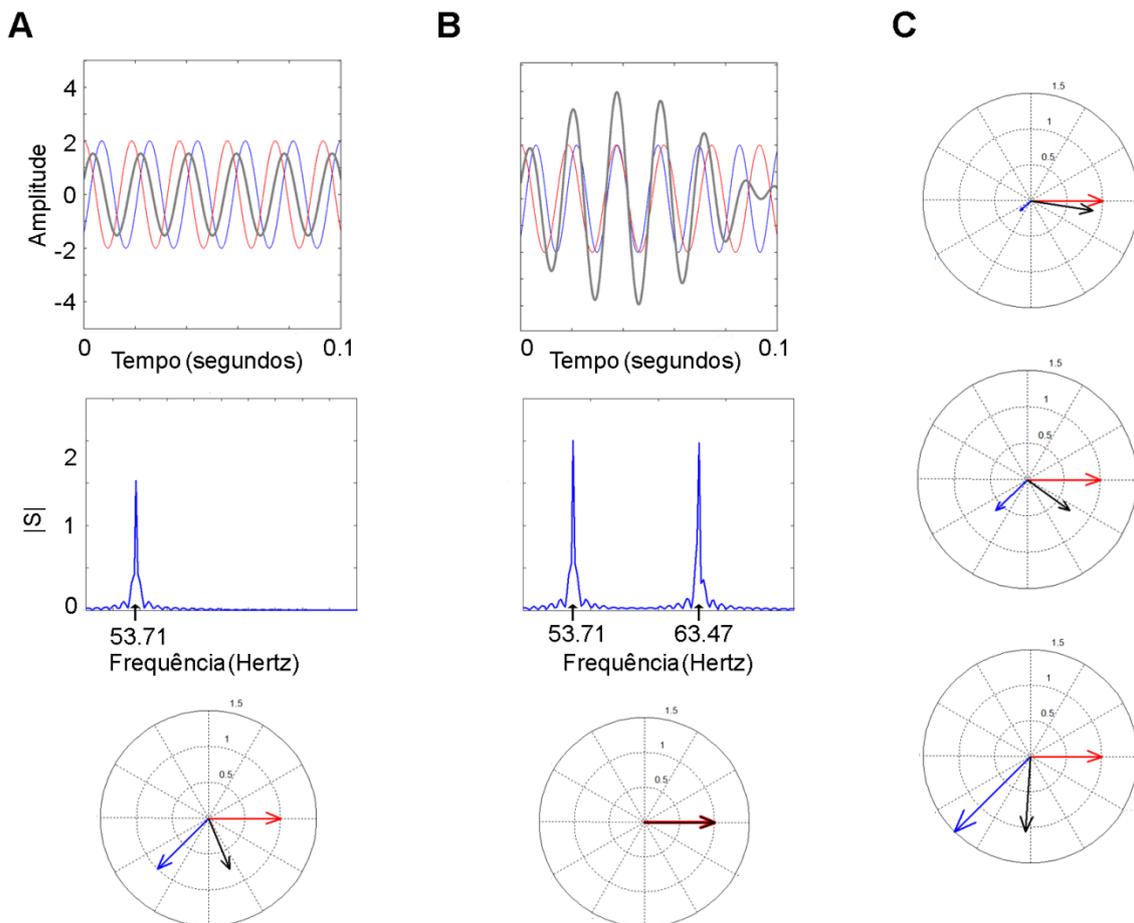


Figura 6 - Simulação de adição de senóides. A. Adição de senóides de 53,71 Hz com a mesma amplitude e diferentes fases (azul e vermelho) gerando um sinal resultante (preto). Espectro de frequências para o sinal resultante com pico em 53,71 Hz. No gráfico polar representando $f = 53,71$ Hz observa-se que o vetor resultante (preto) tem um valor de fase intermediário. B. Adição de senóides de 53,71 (vermelho) e 63,47 Hz (azul) e a resultante em preto. O espectro de frequências do sinal resultante, obtido com o FFT, evidencia picos nas duas frequências que compõem o sinal. No gráfico polar evidencia-se que a adição da senóide de 63,47 Hz não alterou a fase do componente de $f = 53,71$. C. Resultantes (preto) da soma de duas senóides de 53,71 em fases diferentes (vermelho e azul). Se a amplitude da componente representada em vermelho é constante, a fase da resultante é proporcional à amplitude da componente em azul.

2 JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO

A ideia de que a cognição se baseie na capacidade de criar codificações neurais precisas do ambiente encontra objeções filosóficas e, mais recentemente, se tornou tema de investigação científica. Em contrapartida, existe a suposição de que a cognição, na realidade, fundamenta-se na capacidade de modificar estas codificações do ambiente, em dependência do contexto da interação sensorial e das experiências prévias.

No campo da neurociência de sistemas, algumas teorias procuraram formalizar este último paradigma em termos de funcionamento de circuitos neurais. Apesar de, inicialmente, atribuírem-se as funções cognitivas a áreas cerebrais específicas localizadas em estágios altos do sistema nervoso, um número cada vez maior de estudos vem demonstrando que efeitos de variáveis cognitivas se evidenciam também em estágios próximos aos receptores sensoriais. A função desta modulação em estágios iniciais dos sistemas sensoriais, e os mecanismos pelos quais se exercem são, no entanto, um tema ainda incipiente nestas teorias.

No sistema auditivo, o colículo inferior é a principal fonte de projeções para o sistema tálamo-cortical ascendente, e seus neurônios integram informações tanto da via auditiva ascendente do tronco encefálico, como de outras áreas cerebrais relacionadas ao processamento de contextos comportamentais. Isto torna o colículo inferior um estágio fundamental no circuito de processamento de sons do ambiente, passando a ser extremamente relevante a investigação dos mecanismos da modificação da sua atividade neural por influências cognitivas.

3 OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da modulação cognitiva relacionada ao aprendizado associativo nos PEArp obtidos no cóliculo inferior.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito do aprendizado associativo no componente de fase dos PEArp, em termos de seus desvios em relação aos valores basais.
- b) Avaliar dinâmica dos desvios de fase ao longo das apresentações do estímulo condicionado durante o teste.
- c) Avaliar o efeito do aprendizado associativo na estabilidade da fase dos PEArp, em termos do fator de agrupamento de fase durante cada apresentação do estímulo condicionado.
- d) Avaliar a dinâmica do fator de agrupamento de fase ao longo das apresentações do estímulo condicionado no teste.
- e) Avaliar o efeito do aprendizado associativo no componente de amplitude dos PEArp, em termos de variações percentuais em relação aos valores basais.
- f) Avaliar dinâmica das variações de amplitude ao longo das apresentações do estímulo condicionado durante o teste.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DIRETRIZES ÉTICAS NOS EXPERIMENTOS

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sob o número de processo 133/2010 (ver **Anexo I**). Os experimentadores sempre buscaram tomar o máximo de cuidado em relação ao manejo dos ratos durante os experimentos e visaram, por todos os meios disponíveis, a evitar o sofrimento dos animais. Além disso, realizou-se o desenho experimental de modo a utilizar o menor número possível para as comparações estatísticas desejadas. As diretrizes do CEUA-UFMG estão de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e da 'Behavior Guidelines for Animal Experimentation' para manejo e uso de animais em experimentos.

4.2 SUJEITOS EXPERIMENTAIS

Neste trabalho, doze ratos albinos machos da linhagem Wistar, com peso entre 270 e 310 gramas (aproximadamente 08 semanas de idade), foram usados como sujeitos experimentais. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CeBIO-ICB/UFMG). Anteriormente aos experimentos, os animais foram mantidos em biotério, agrupados em caixas com 04 animais cada, com comida e água *ad libitum*, submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura ambiente de $22^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C. Após as cirurgias de implante de eletrodos e durante os experimentos de condicionamento, os animais foram mantidos em gaiolas isoladas, porém com tampas elevadas, o que permitia o contato social com animais de outras gaiolas.

Para serem usados em todas as análises propostas no trabalho, os sujeitos experimentais deveriam atender a três critérios de inclusão estabelecidos *a priori*:

1. O eletrodo de registro, à verificação histológica, deveria estar corretamente posicionado no núcleo central do colículo inferior;
2. Os potenciais evocados transitórios deveriam apresentar os componentes já classicamente descritos para registros no colículo inferior, além de tais componentes deverem se manter estáveis até o último dia de experimento.
3. O comportamento exploratório dos animais deveria ser normal (i.e. baixa porcentagem de tempo em comportamento de congelamento) anteriormente ao condicionamento ao medo.

4.3 CIRURGIA

Os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (30mg/kg) e xilazina (5mg/kg), de acordo com as recomendações do comitê de ética no uso de animais da UFMG (CEUA-UFMG) e a indução anestésica foi verificada antes do início dos procedimentos operatórios. Após a indução, a região superior da cabeça foi tricotomizada com tosquiador e degermada com solução de PVPI. A partir de então, até o fim da cirurgia, a temperatura dos animais foi monitorada por meio de termômetro digital introduzido no reto e mantida em torno de 37,5 °C utilizando-se manta térmica. A profundidade da anestesia foi periodicamente verificada durante a cirurgia por meio de estímulo doloroso de pinçamento auricular, e no caso de reação do animal a cirurgia era interrompida e um reforço anestésico de 0,1 mL de cetamina (10g/100 mL) era aplicado por via intraperitoneal. Para todos os animais que necessitaram de reforço anestésico, somente uma dose adicional foi suficiente para o fim do procedimento cirúrgico.

Em seguida, os animais foram posicionados em aparelho estereotáxico (*Stoelting Co.*) e fixados por meio de barras auriculares, maciça à direita, perfurada e oca à esquerda (a barra à esquerda permitia a condução do som ao ouvido do animal para a posterior verificação do correto posicionamento do eletrodo por meio de respostas evocadas). Após a fixação, realizou-se uma excisão elíptica da pele iniciando-se na linha interauricular e se estendendo aproximadamente 0,8 centímetros anteriormente, com largura de aproximadamente 0,5 centímetros. O tecido subcutâneo foi removido e foi realizada limpeza da região com peróxido de hidrogênio (10 volumes) seguido de salina para exposição do crânio e das suturas.

Após o nivelamento dorso-ventral das suturas lambda e bregma realizou-se trepanação para fixação de parafusos de aço (*Fine Science Tools*, nº 19010-00) em 03 pontos do crânio: no osso nasal bilateralmente (terra à direita e referência à esquerda) e no osso parietal à esquerda (não conectado). Realizou-se mais uma trepanação nas coordenadas AP: -9,0mm, LL: +1,8 em relação ao bregma (Paxinos e Watson, 1998) para implantação do eletrodo ativo em contato com a dura-máter. Com o animal ainda no estereotáxico, iniciou-se uma varredura DV do eletrodo ativo juntamente com registro eletrofisiológico, até que uma resposta evocada auditiva a um “tone burst” de 10 kHz fosse visualizada. Nesse ponto, geralmente em torno de 3,0 a 3,5 mm, o eletrodo foi fixado com cimento de zinco. Os três eletrodos (terra, referência e ativo) foram então soldados em conector RJ-11 e a ferida cirúrgica foi coberta com acrílico odontológico (ver **figura 07**).

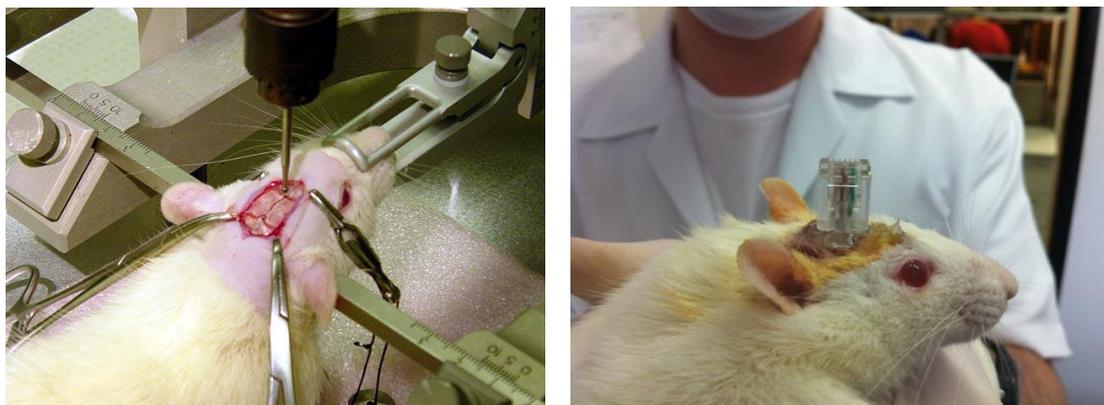


Figura 7 – Cirurgia estereotáxica para implante de eletrodo no CI. Esquerda: Animal anestesiado posicionado no estereotáxico. É possível visualizar o bregma, próximo à ponta da broca odontológica, anteriormente ao qual se fixaram os parafusos de terra e referência; e o lambda, posteriormente. Direita: animal após a cirurgia com os eletrodos já implantados e soldados no conector RJ 11.

Ao fim da cirurgia, os animais receberam, por via intramuscular, uma dose de 5,0 mg/kg de pentabiótico veterinário (Baytril®) e uma dose de 2,5 mg/kg de anti-inflamatório (Banamine®). Os animais foram mantidos na manta térmica até que recuperassem da indução anestésica, quando foram então transferidos para gaiolas individuais.

4.4 ESTÍMULOS AUDITIVOS

Nos experimentos deste trabalho, foram utilizados tons AM como estímulo condicionado (EC). Os tons modulados em amplitude são funções $x(t)$ no domínio do tempo, que podem ser descritas de acordo com a fórmula:

$$x(t) = A \cdot \text{sen}(2\pi f_c t) \cdot (\lambda \cdot \text{sen}(2\pi f_m t) + 1) / (1 + \lambda),$$

em que a senóide de alta frequência (f_c) é a portadora enquanto a senóide de baixa frequência (f_m) é a moduladora, λ é a profundidade de modulação e A é a amplitude máxima. Como usamos $\lambda = 1$, a fórmula pode ser simplificada para

$$x(t) = A \cdot \text{sen}(2\pi f_c t) \cdot (\text{sen}(2\pi f_m t) + 1) / 2$$

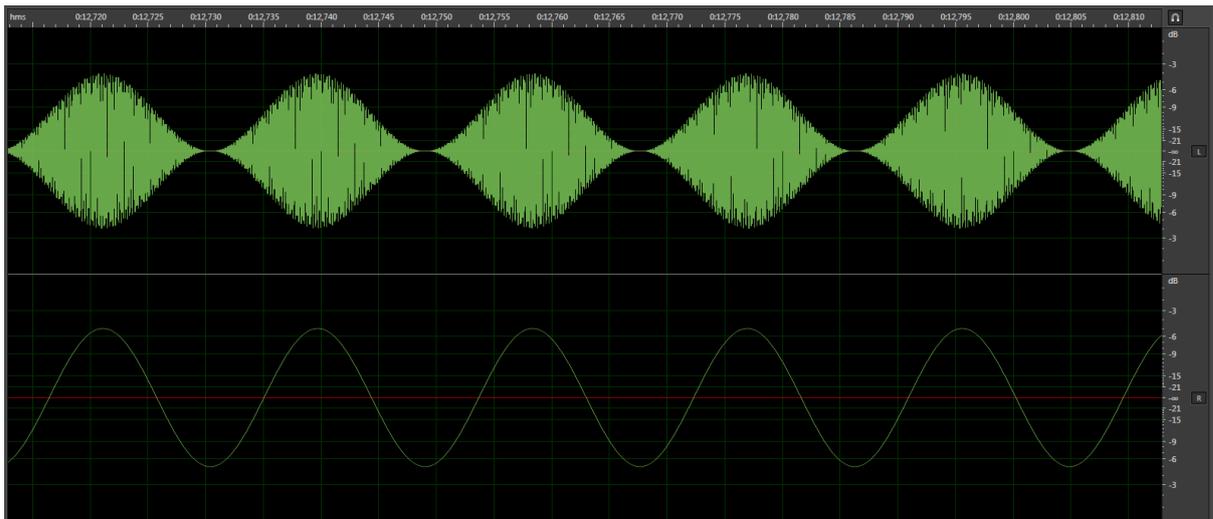


Figura 8 - Tom modulado em amplitude para obtenção dos PEArp. Janela de 100 milissegundos do software Adobe Audition 3.0. O primeiro canal (acima) é o EC reproduzido pelo sistema de som; e o segundo canal (abaixo) é a senóide, registrada para servir de referência de fase para o LFP.

No programa Adobe Audition (Adobe Systems Inc., versão 3.0) foi gerada uma trilha com dois canais (ver **figura 08**) a uma taxa de amostragem de 44.1 kHz: o primeiro canal (EC propriamente dito) consistia de um tom puro de 10 kHz, com amplitude modulada a uma frequência de 53,71 Hz, profundidade de modulação de 100% e 30 segundos de duração; o segundo canal consistia de uma onda senoidal nas mesmas frequência e fase da senóide moduladora do primeiro canal. Esta trilha

foi gravada em CD no formato MP3 e reproduzida por um tocador de CD (*Panasonic*, SL-S140) de modo que o primeiro canal fosse reproduzido pelo sistema de reprodução de som e o segundo canal fosse registrado como um canal pelo condicionador analógico de sinais. A saída do primeiro canal foi, então, conectada a um amplificador automotivo (MXR 2250 – 500 watts), que por sua vez se conectava a um alto falante (*Selenium T-40*). O alto falante foi acondicionado numa caixa metálica, para blindagem eletromagnética, forrada internamente com espuma acústica. O estímulo sonoro foi conduzido por um tubo de borracha até o topo das caixas de acrílico ou de condicionamento e a intensidade do som no interior das caixas foi calibrada antes de cada sessão experimental para 82 dBA SPL (*Brüel & Kjær*, Type 2236) no centro da caixa.

A frequência de modulação de 53,71 Hz foi escolhida de maneira que uma janela de análise espectral de 204,8 milissegundos contivesse um número inteiro de oscilações para esta frequência a uma taxa de amostragem de 20 kHz (*Jiangtao e Chicharo, 1996*).



Figura 9 – Estímulo transiente para obtenção de PEAt. Janela de 600 milissegundos do software Adobe Audition 3.0. O primeiro canal (acima) é o ‘tone burst’ reproduzido pelo sistema de som; e o segundo canal (abaixo) é a onda quadrada usada como gatilho que marca o início da janela a ser recortada para a realização de médias do LFP.

Para a obtenção dos PEAt foi gerada também no software Adobe Audition uma trilha com dois canais (ver **figura 09**): o primeiro canal consistia de um tom puro

de 10 kHz com 50 milissegundos de duração. O intervalo entre estímulos de 500 milissegundos, o que garantia uma frequência de estimulação de 2 Hz; o segundo canal consistia de uma onda quadrada que se iniciava simultaneamente ao tom puro. Este segundo canal foi usado como gatilho para marcar o início das janelas a serem recortadas no LFP, com as quais se realizaram as médias para obtenção dos PEAt. A gravação e a reprodução desta trilha foi idêntica à da trilha descrita anteriormente.

4.5 CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AVERSIVO

Durante os cinco dias em que se recuperavam do procedimento cirúrgico, os animais foram diariamente manipulados pelo experimentador 01, que também os manipulou no pré-treino e no teste. No último dia de manipulação os animais foram aleatoriamente sorteados para um dos dois grupos experimentais: 1) pareado ou 2) não pareado. O protocolo de condicionamento propriamente dito consistiu de três dias consecutivos (aqui denominados de pré-treino, treino e teste respectivamente) e os experimentos sempre se iniciaram em torno do meio-dia, com ordem aleatorizada dos animais a serem submetidos ao protocolo. A **figura 10** apresenta um desenho esquemático do protocolo de condicionamento usado neste trabalho.

No pré-treino e no teste, independentemente do grupo experimental, os animais foram expostos a uma sequência de cinco apresentações do EC, com um intervalo médio entre os EC variando de 30 a 120 segundos (média de 50 segundos). Nestes dias, os experimentos ocorreram no contexto A (caixa de acrílico preta nas proporções de 30x20x25 cm, aromatizada com essência de eucalipto, acondicionada no interior de uma gaiola de Faraday acusticamente isolada e animais manipulados pelo experimentador 01).

No treino, os animais foram expostos a uma sequência de cinco apresentações do EC, com um intervalo médio entre os EC variando de 30 a 120 segundos (média de 50 segundos), porém neste dia receberam também cinco apresentações do estímulo não condicionado (ENC). O ENC usado no treino consistiu de uma corrente alternada (0,4 mA durante 2 segundos) aplicada à pata dos animais por meio de barras de metal no chão da caixa de condicionamento

(*Insight*, modelo EP 111). O padrão de apresentação do ENC foi dependente do grupo experimental: no grupo pareado, necessariamente, os últimos 2 segundos do EC coincidem com o ENC; já no grupo não pareado a apresentação do ENC foi pseudorandomizada, de modo que, necessariamente, não coincidia com a ocorrência do EC. Neste dia, o experimento ocorreu no contexto B (caixa de condicionamento nas proporções de 23x23x23 cm, aromatizada com ácido acético a 1%, e animais manipulados pelo experimentador 02).

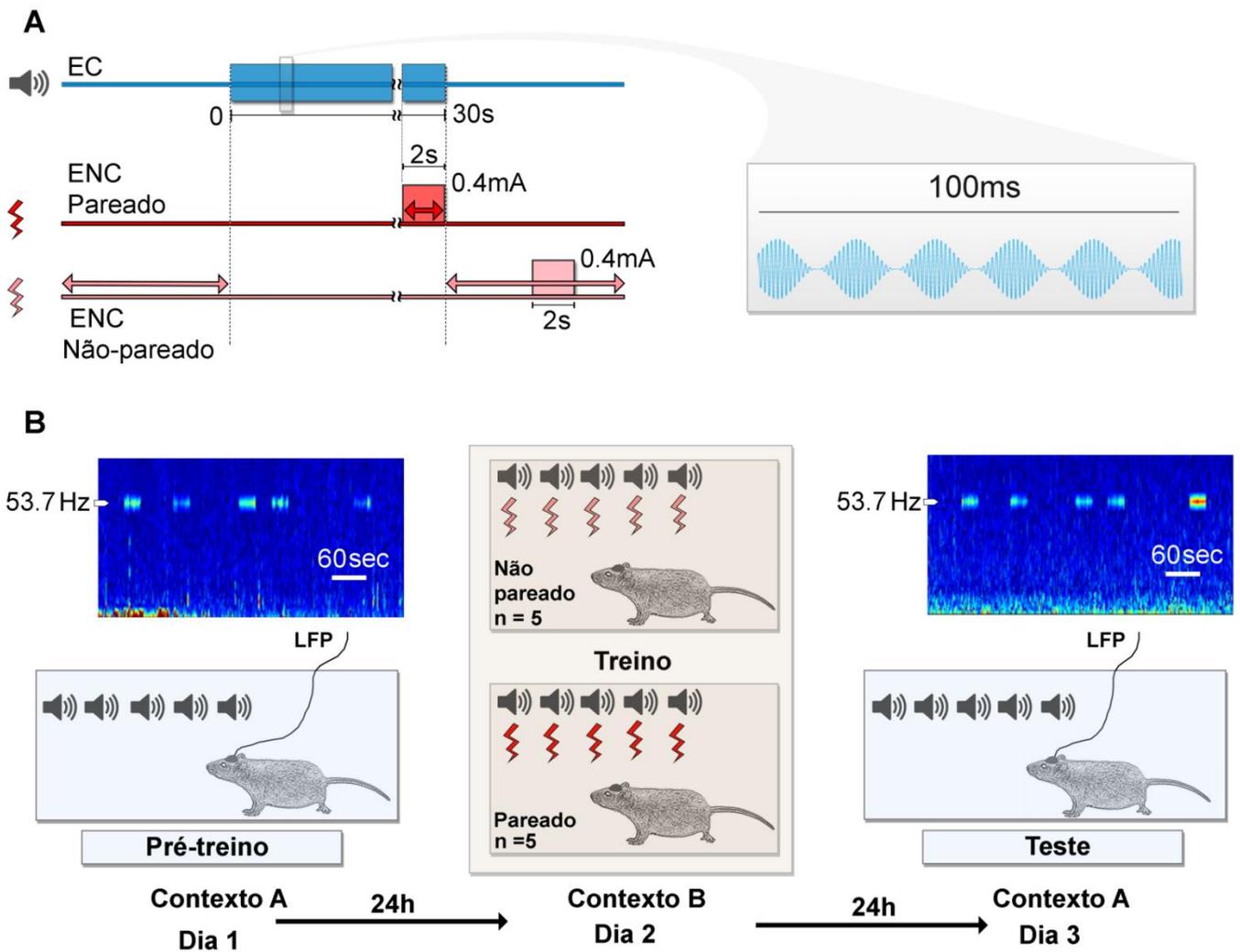


Figura 10 – Desenho esquemático do protocolo de condicionamento ao medo auditivo. **A.** Parâmetros do EC e do ENC e padrão de temporização entre EC e ENC nos grupos pareado (vermelho) e não pareado (rosa). A figura à direita é uma expansão de uma janela de 100 ms do EC. **B.** Esquema do protocolo de condicionamento ao medo e exemplos de espectrograma evidenciando as respostas evocadas no pré-treino e no teste.

A temporização pareada e não pareada da apresentação do EC e do ENC foi determinada pelo software da caixa de condicionamento que aciona ambos os estímulos.

A quantificação do comportamento de congelamento foi feita *a posteriori* por análise dos vídeos das sessões de condicionamento por um experimentador cego. O congelamento foi definido como ausência total de movimentos, exceto movimentos respiratórios, e foi numericamente expresso como porcentagem de tempo que o animal permaneceu congelado durante cada apresentação do EC. Para o cálculo desta porcentagem, os 30 segundos de apresentação de cada EC foi dividido em seis janelas de 5 segundos (cada janela correspondendo a 16,7 % do tempo total). Se, dentro desta janela, o animal por 2 segundos contínuos permanecesse congelado a janela era considerada uma janela de congelamento. Já os registros eletrofisiológicos aconteceram somente no pré-treino e no teste, já que no dia do treino, o fato de a gaiola de condicionamento estar ligada à rede elétrica introduzia uma grande quantidade de ruído ao registro biológico, impossibilitando sua análise.

Após o último registro, anestesiaram-se os animais com uma dose de uretana, e em seguida aplicou-se uma corrente eletrolítica (2mA durante 2 segundos) por meio do eletrodo ativo. Esta corrente gera uma pequena lesão no entorno da ponta do eletrodo. Ainda sob o efeito da anestesia, os animais foram sacrificados por meio de perfusão intracardíaca com solução de salina a 0,9% seguida de paraformaldeído a 10%. Os encéfalos foram retirados e armazenados por 07 dias: em paraformaldeído a 10% por 05 dias, e em solução de sacarose a 30% por 02 dias. Após os 07 dias, as peças anatômicas foram fatiadas em micrótomo criostato em cortes sagitais com espessura de 50 µm e as fatias montadas em lâminas histológicas gelatinizadas, e no dia seguinte coradas com corante Vermelho Neutro. Localizou-se nas lâminas a lesão gerada pela corrente eletrolítica e comparou-se o local da lesão com imagens de atlas histológico de ratos (ver **figura 13**).

4.6 REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS

Em um primeiro canal, potenciais de campo local foram registrados em configuração monopolar por meio de um eletrodo ativo no CI (fio de tungstênio encapado com teflon com espessura externa de aproximadamente 60 μ m.) e referência no osso nasal. Em um segundo canal, registrou-se uma onda senoidal com a mesma frequência e fase da moduladora. Este sinal foi usado como referência para o cálculo da fase do LFP (ver **figura 11**).

Durante os registros, ambos os sinais foram filtrados na banda de 1-2000 Hz e amplificados a 20000 V/V por um condicionador analógico de sinais (*Axon Instruments, Cyberamp 320*). Em caso de saturação do sinal para alguns animais específicos, a amplificação era reduzida para 10000 V/V e assim mantida durante todos os registros para o animal. Após o processamento analógico, os sinais foram digitalizados a uma taxa de amostragem de 20 kHz (*National Instruments, NI-DAQ*

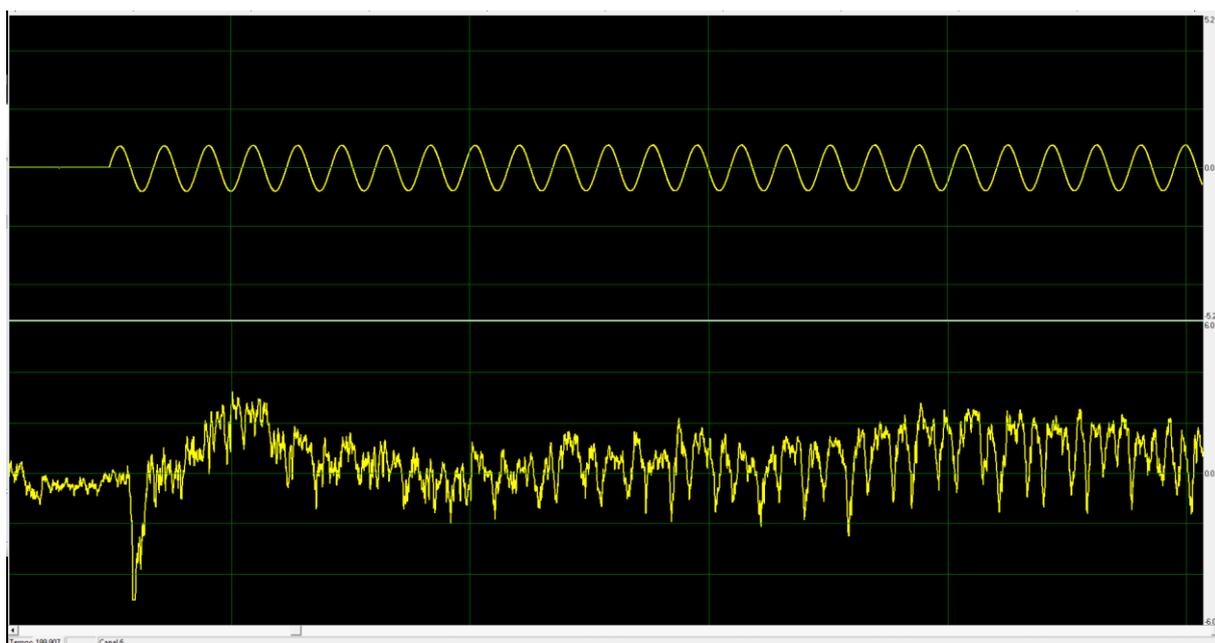


Figura 11 – Visualização do registro eletrofisiológico no software Kananda. A janela mostrada corresponde a 500 ms de registro e cada tem 100 ms. No primeiro canal (acima) registrou-se a senóide com a mesma frequência e fase de f_m . No segundo canal (abaixo) registrou-se o LFP do CI em resposta ao tom AM. Após o início do som observa-se um primeiro componente transitório e após cerca de 200 ms evidenciam-se as oscilações características do PEArp.

6023E). Foi utilizado o software Kananda para a visualização dos sinais, tanto na varredura DV para encontrar o sinal no CI (ver *Cirurgia*) quanto durante os experimentos de condicionamento.

Após os experimentos no primeiro e no terceiro dia, os animais foram apresentados a 50 “tone bursts” (ver seção 4.4) para obtenção dos PEAt do CI. Os formatos de onda foram obtidos por promediação de 50 janelas de 100 milissegundos sincronizadas com a onda quadrada registrada no segundo canal que marcava o início do estímulo. O tempo que estímulo acústico gastou para viajar do alto-falante até o ouvido do animal foi calculado considerando que a velocidade do som no ar é de 340 m/s. Como o comprimento do tubo de borracha que conduziu o som era de 1,02 metros, o tempo estimado foi de 3 ms. Este valor foi subtraído das latências dos PEAt e todos os valores apresentados nos resultados já apresentam esta correção.

4.7 PROCESSAMENTO DIGITAL DOS SINAIS

A análise tempo-frequência dos sinais de LFP registrados foi feita em software escrito em MATLAB 7.12 R2011a utilizando-se a função *spectrogram*, que aplica a **transformada de Fourier de tempo reduzido ao sinal (STFT, do inglês *Short Time Fourier Transform*)**. A STFT é uma variante da transformada rápida de Fourier (FFT, do inglês *Fast Fourier Transform*) e realiza uma transformada de Fourier dentro de uma janela temporal que se move ao longo da série temporal $s(t)$. Esta janela móvel permite a caracterização de variações de amplitude e fase do LFP ao longo do tempo. A limitação mais importante desta técnica de decomposição espectral consiste no fato de a janela de análise ter o mesmo tamanho para análise de todas as frequências do espectro. Como a caracterização ótima de altas frequências requer janelas menores que a caracterização ótima das baixas frequências, quando se usa a mesma janela para analisar diferentes bandas do espectro, pode-se gerar um artefato inerente à técnica na comparação entre as bandas (Roach e Mathalon, 2008). No caso do presente trabalho, como as comparações serão feitas sempre entre médias calculadas para o mesmo valor ou

banda de frequência, consideramos que esta não seria uma limitação para a utilização deste método.

Para o cálculo da STFT utilizaram-se janelas Hanning não sobrepostas contendo 4096 pontos (204,8 milissegundos) da série temporal $s(t)$, que continham 11 ciclos inteiros de f_m . O resultado dessa análise espectral é uma representação espectro-temporal complexa S :

$$S(f, t) = A(f, t). e^{i\theta(f, t)}$$

em que A e θ são, respectivamente, amplitude e fase da frequência f na janela espectral do momento t da análise tempo-frequência, e é o número de Euler e i é a unidade imaginária. A amplitude e a fase de cada janela espectral foram definidas, respectivamente, como o módulo e o argumento complexo de S :

$$A(f, t) = |S(f, t)|$$

$$\theta(f, t) = \arg [S(f, t)]$$

Para todas as análises subsequentes dos PEArp:

1. θ do segundo canal (senóide em f_m) foi subtraída de θ do primeiro canal (LFP);
2. A e θ foram consideradas somente nas janelas t de apresentação do EC e na frequência f_m .

A amplitude basal A_b dos PEArp foi calculada para cada animal como a média da amplitude em f_m para todas as p janelas espectrais do pré-treino em que houve apresentação do EC. As amplitudes normalizadas A_{norm} dos PEArp de cada animal, para todas as n janelas espectrais do pré-treino e do teste em que houve apresentação do EC foram expressas como porcentagem em relação à amplitude basal. Os resultados que representam um único valor de amplitude para cada EC foram obtidos realizando a média das A_{norm} de todas as janelas espectrais referentes àquele EC.

$$A_b(fm) = \frac{1}{P} \sum_{p=1}^P A(fm, p)$$

$$A_{norm}(fm, n) = \frac{A(fm, n)}{A_b(fm)}$$

A fase basal θ_b para cada animal foi definida como a direção angular média (também chamada de média circular) das mesmas p janelas espectrais do pré-treino usadas para o cálculo da amplitude basal. θ_b é o argumento do vetor resultante ρ_b destes p coeficientes complexos em f_m , após terem sido normalizados para a amplitude unitária:

$$\rho_b = \frac{1}{p} \sum_{p=1}^p e^{i\theta(p)}$$

$$\theta_b = \arg(\bar{\rho})$$

As fases normalizadas θ_{norm} dos PEArp de cada animal, para todas as n janelas espectrais do pré-treino e do teste em que houve apresentação do EC, foram expressas como desvio de fase em relação à fase basal em graus, no intervalo $\pm 180^\circ$.

$$\theta_{norm}(fm, n) = \theta(fm, n) - \theta_b$$

Os resultados que representam um único valor de fase para cada EC foram obtidos realizando a média circular das θ_{norm} de todas as janelas espectrais referentes àquele EC. A comparação de grupos se baseou então no cálculo de média aritmética \pm E.P.M. destes valores para os cinco animais de cada grupo.

Para a avaliação da dinâmica temporal das variações de fase, o vetor de 148 valores complexos para cada EC de cada animal foi mantido e a média \pm E.P.M. foi calculado janela por janela para os cinco animais. Portanto obtiveram-se 148 valores de média \pm E.P.M. Para a análise estatística da dinâmica temporal, dividiram-se os vetores de 148 valores de cada animal em três partes (49+49+50 janelas). A média circular de cada bloco constituiu a variável para o cálculo da média \pm E.P.M.

Para a análise da estabilidade da fase dentro de cada apresentação do EC, foi usado o **fator de agrupamento de fase (PLF, do inglês *phase-locking factor*)** (Lachaux, Rodriguez *et al.*, 1999; Fisher, 1996; Tallon-Baudry, Bertrand *et al.*, 1997), definido como

$$PLF = \frac{1}{N} \left| \sum_{n=1}^N e^{i\theta(n)} \right|$$

em que N é o número de janelas espectrais durante a apresentação do EC.

O PLF foi calculado para as mesmas janelas usadas para calcularem-se os valores de amplitude e fase, obtendo-se da mesma forma um único valor para cada apresentação do EC, que é um número real variando entre zero e um. Para as N janelas de qualquer apresentação do EC, e considerando os valores de fase podendo se distribuir em torno de um intervalo de $\pm 180^\circ$, $PLF = 0$ significa uma distribuição uniforme dos N valores de fase, e $PLF = 1$ significa uma perfeita sincronização de fase em torno de um valor θ específico.

Para a caracterização espectral do sinal em outras frequências além de f_m , o valor absoluto do resultado obtido pela STFT foi dividido em bandas de frequência, eliminando-se, com uma faixa de segurança, as regiões próximas a f_m para evitar contaminação por componentes referentes à resposta evocada. Como a realização da STFT com janelas de 4096 pontos fornece uma definição de frequências pouco precisa, para esta análise, os mesmos sinais foram analisados com janelas de 16384 pontos com sobreposição de 12288 pontos. As bandas de frequência foram definidas da seguinte maneira:

	Faixa de frequência (Hz)	Colunado espectrograma
Delta	1,22 a 3,66	2 a 4
Teta	4,88 a 9,76	5 a 9
Alfa	10,98 a 15,86	10 a 14
Beta	17,08 a 29,29	15 a 25
Gama	30,51 a 46,38 + 65,91 a 90,33	26 a 39 + 55 a 75

Tabela 1 - Definição das faixas de frequência do LFP e sua correspondência com as colunas geradas no espectrograma.

Para a análise da banda gama do LFP, as colunas 40 a 54 do espectrograma (o que significa a faixa espectral de $f_m \pm 10$ Hz) foram eliminadas, já que f_m (coluna 45 do espectrograma) coincide com esta banda de frequência. Pela **figura 12** fica claro

que este é um intervalo confiável para concluir que as alterações observadas na banda gama não se devem a espalhamento espectral de f_m , já que o aumento de energia relacionado aos PEArp se localizam no máximo nas colunas 44, 45 e 46 do espectrograma (52,49 a 54,93 Hz).

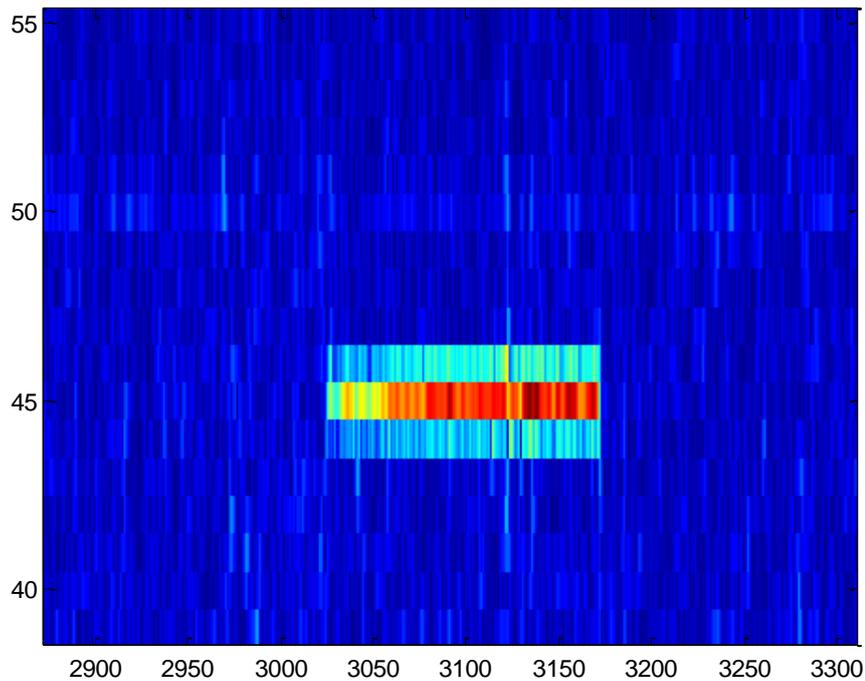


Figura 12 – Faixa de frequência removida para caracterização espectral do LFP. Os eixos x e y representam os índices de frequência e tempo respectivamente, fornecidos pela STFT. Observa-se o PEArp em f_m , com algum espalhamento espectral nas bandas de frequência adjacente, mas que certamente não se estende para a faixa de segurança estabelecida.

Para a análise de grupo, os valores referentes às bandas de frequência foram integrados, gerando um único vetor de valores para cada banda. Em seguida foi calculado um fator de normalização para cada banda, definido como a média de todo o período de silêncio anterior à apresentação do estímulo acústico no pré-treino. Os valores contidos no vetor de cada banda de frequência foram divididos então pelo seu fator de normalização. A variável usada na comparação de grupos foi a média dos valores normalizados em janelas de 30 segundos em três períodos distintos: 1) os 30 segundos anteriores ao início da apresentação do primeiro EC (BS), 2) os 30 segundos durante a apresentação do EC e 3) os 30 segundos posteriores à apresentação de cada EC.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis usadas nos testes de média paramétricos apresentaram distribuição que não diferiu de uma distribuição normal padrão (teste de Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,10$).

Para a comparação entre grupos experimentais, utilizou-se análise de variância de dois fatores com medidas repetidas (RM-ANOVA, do inglês *repeated measures analysis of variance*). O fator inter-grupo foi o grupo experimental (dois níveis: pareado ou não pareado) e o fator intra-grupo foi a apresentação do EC (dez níveis: apresentações de 1 a 10, sendo 5 no pré-treino e 5 no teste). No caso de interação significativa entre os fatores, as comparações foram feitas usando-se o teste *post hoc* de Bonferroni, com um nível de significância a 5%. Para indicar diferença significativa entre médias na comparação intra-grupo utilizou-se cerquilha (# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$), e para indicar diferença significativa entre médias na comparação inter-grupo utilizou-se asterisco (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Quando o interesse era comparar apenas a variação de um fator dentro do grupo, utilizou-se análise de variância de um fator. Nestes casos, sempre o objetivo era comparar as médias com um valor de referência do pré-treino (definido como a primeira apresentação do EC), e, portanto, escolheu-se, no caso de haver diferença entre as médias, aplicar o teste *post hoc* de Dunnet. Para indicar diferença significativa entre médias utilizou-se asterisco (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Para a comparação dos rankings de desvio de fase utilizou-se o teste não paramétrico de Friedman e no caso de haver diferença entre grupos aplicou-se o teste *post hoc* de Dunn. As diferenças significativas foram indicadas com asterisco (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DOS CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A exclusão dos animais foi feita após o sorteio de cada animal para seu grupo experimental e a realização de todos os experimentos. Adotando-se os critérios de inclusão mencionados anteriormente (ver *Materiais e métodos*), um dos animais foi excluído do grupo pareado devido a posicionamento incorreto de eletrodo e outro foi excluído do grupo não pareado por apresentar comportamento de congelamento exacerbado anteriormente ao condicionamento ao medo. Nas figuras que apresentamos no trabalho, estes animais já foram excluídos, portanto o grupo pareado e o grupo não pareado contaram com cinco animais cada.

5.1.1 POSICIONAMENTO DO ELETRODO DE REGISTRO

Antes de prosseguir com as análises eletrofisiológicas, a posição dos eletrodos de registro foi confirmada por análise das lâminas histológicas (ver *Materiais e métodos*). Como vemos na **figura 13**, a corrente eletrolítica aplicada causa uma lesão em todo o trajeto do eletrodo. Uma vez que o eletrodo consistiu de um fio de tungstênio encapado com teflon em toda sua extensão, e desencapado apenas em sua extremidade terminal, consideramos que os neurônios que geraram os LFP registrados se localizavam no final da lesão (seta preta). Assim, reconstruímos a posição da extremidade terminal para os dez animais usados (ver **figura 13 B**). Após a reconstrução, fica claro que, apesar de alguns eletrodos terem se localizado próximo ao córtex externo e outros próximo do córtex dorsal do CI, podemos afirmar que independente do grupo experimental, o local de registro dos LFP ficou em torno do núcleo central do CI. Aqui, vale lembrar que o alto índice de acerto é em parte decorrente da estratégia de, durante a cirurgia, realizar a varredura em procura de um PEAt robusto antes de fixarmos o eletrodo.

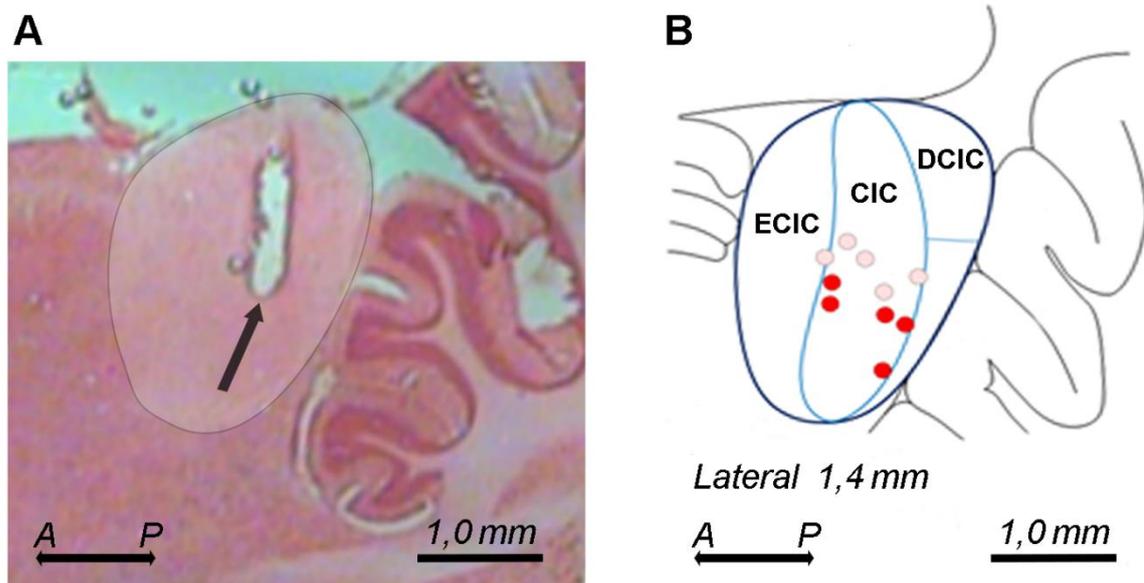


Figura 13 - Posição dos eletrodos de registro no colículo inferior A. Lâmina histológica com corte sagital de tronco encefálico evidenciando lesão eletrolítica no núcleo central do colículo inferior direito (seta preta). Em posição ântero-dorsal ao colículo inferior vemos o uma porção do colículo superior, e em posição pósterio-ventral vemos uma porção do cerebelo. O córtex e o hipocampo foram removidos para a montagem das lâminas histológicas. B. Figura modificada do atlas histológico, em corte sagital a 1,4 mm lateralmente ao bregma. Os círculos indicam a posição dos eletrodos nos animais do grupo pareado (vermelho) e do grupo não pareado (rosa). CIC: núcleo central do colículo inferior; DCIC: córtex dorsal do colículo inferior. ECIC: córtex externo do colículo inferior; A: anterior; P: posterior.

5.1.2 ANÁLISE QUALITATIVA DOS PEAT

Os estímulos transientes usados foram efetivos em evocar PEAt (ver **figura 14**). Os PEAt obtidos no CI apresentaram um pico positivo em torno 05 milissegundos seguido de uma proeminente negatividade em torno de 10 milissegundos e de uma deflexão positiva em torno de 50 ms. Os formatos de onda obtidos no pré-treino foram qualitativamente comparados com os formatos de onda do teste para avaliação da estabilidade dos componentes ao longo do protocolo de condicionamento. Não houve variações evidentes dos componentes dos PEAt nestes dias, o garante que os registros do pré-treino e do teste refletiam a atividade do mesmo grupo neuronal.

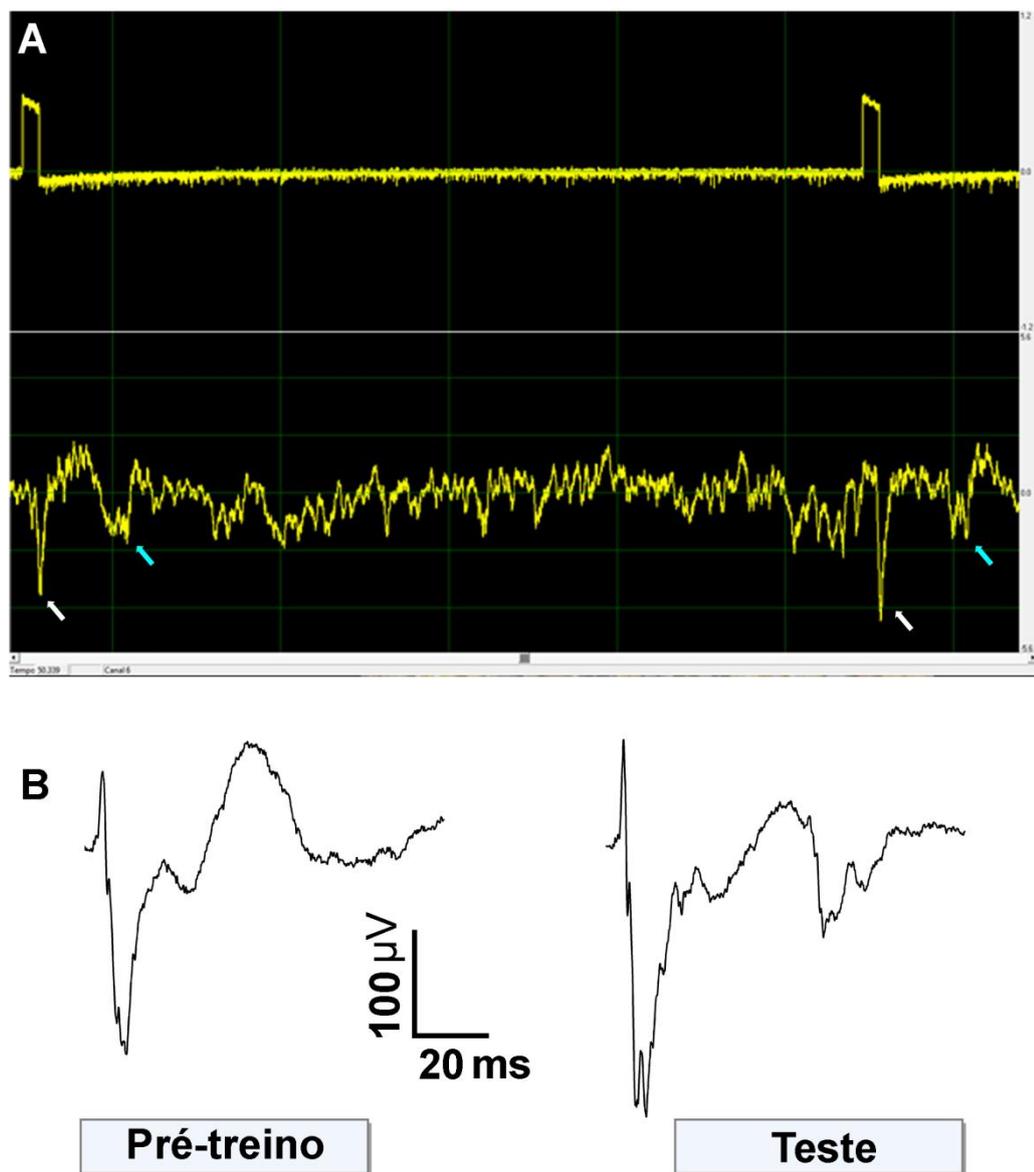


Figura 14 – PEAt obtidos no CI **A**. Janela de 600 ms do software de registro Kananda. No primeiro canal (acima) registrou-se a onda quadrada usada como gatilho. No segundo canal registrou-se o LFP do CI em resposta ao ‘tone burst’ reproduzido. A resposta evocada no CI é facilmente evidente à inspeção do registro, sendo identificáveis os componentes de curta (seta branca) e média latência (seta azul). **B**. Formato de onda após realização da média de 50 janelas de 100 ms sincronizadas com o início do estímulo. Os componentes principais do PEAt se mantêm os mesmos após o condicionamento.

5.1.3 PADRÃO COMPORTAMENTAL

Para as análises subsequentes, adotamos a premissa de que o EC tinha valência neutra para os animais antes do condicionamento, portanto, esperávamos que os animais apresentassem comportamento exploratório normal durante a apresentação do EC. Um dos animais que havia sido sorteado para o grupo não-pareado apresentou taxas de congelamento em torno de 100 % durante todo o pré-treino, independente da apresentação do EC ou não. Este animal foi excluído das análises posteriores.

5.2 RESULTADOS COMPORTAMENTAIS

No pré-treino, os animais permaneceram a maior parte do tempo de apresentação do EC em comportamento exploratório, o que qualifica o EC e também o contexto A (que inclui o experimentador 01) como neutros inicialmente para os animais. Na **figura 15**, fica evidente que neste dia do protocolo, os animais de ambos os grupos apresentaram baixas percentagens de comportamento de congelamento, menores que 25% para todas as cinco apresentações do EC. A comparação de médias das dez apresentações do EC nos dois grupos por meio de RM-ANOVA de dois fatores (grupo e ordem do EC) evidenciou uma interação grupo-ordem significativa ($F_{9,72} = 5.746, p < 0.05$). Entretanto, não houve diferença entre os níveis de congelamento do grupo pareado e do grupo não-pareado no pré-treino ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni).

Não foram representadas as porcentagens de congelamento no dia do treino, já que este comportamento nos dias de apresentação do EC se apresenta bastante elevado igualmente nos dois grupos experimentais. Adicionalmente, as apresentações do EC neste dia foram feitas em no contexto B o que certamente adicionaria um componente contextual à resposta condicionada. Portanto, a medida do congelamento, ou mesmo de outras respostas condicionadas, no dia do treino não constitui uma medida apropriada do aprendizado associativo no condicionamento ao medo.

No dia do teste, foi possível estabelecer uma diferenciação comportamental entre os dois grupos. Após o condicionamento ao medo, o grupo pareado apresentou aumento da porcentagem de congelamento, evidenciando aprendizado associativo após o treino. Este aumento foi significativo na comparação intra-grupo logo na primeira apresentação do EC no teste ($p < 0,01$ na primeira apresentação e $p < 0,001$ nas apresentações seguintes, pós-teste de Bonferroni), e na comparação inter-grupo só foi significativa a partir da segunda apresentação do EC ($p < 0,05$ no segundo EC, $p < 0,01$ no terceiro e quarto EC e $p < 0,001$ no quinto EC, pós-teste de Bonferroni; ver **figura 15** e **tabela 02**). É notável que a partir da segunda apresentação do EC e em todas as apresentações subsequentes do EC, o percentual de congelamento no grupo pareado ficou em torno de 100%. O grupo não-pareado, por sua vez, se comportou como o controle esperado, não apresentando aprendizado associativo da resposta condicionada comportamental. O percentual de congelamento não variou significativamente em relação aos valores do pré-treino ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) e continuou em torno de 25% no dia do teste.

Pré - Treino					
	EC 1	EC 2	EC 3	EC 4	EC 5
Pareado	10,0 ± 10,0	16,7 ± 12,9	33,3 ± 19,0	03,3 ± 03,3	03,3 ± 03,3
Não-pareado	19,9 ± 13,3	0 ± 0	6,7 ± 6,7	16,7 ± 9,1	26,7 ± 19,4

Teste					
	EC 1	EC 2	EC 3	EC 4	EC 5
Pareado	66,7 ± 11,8	93,3 ± 4,1	89,9 ± 4,1	96,7 ± 03,3	96,7 ± 03,3
Não-pareado	20,0 ± 16,2	40,0 ± 17,2	16,7 ± 12,9	16,7 ± 16,7	33,3 ± 17,5

Tabela 2 – Porcentagem de comportamento de congelamento durante as apresentações do EC. Média ± E.P.M., n = 5 animais por grupo.

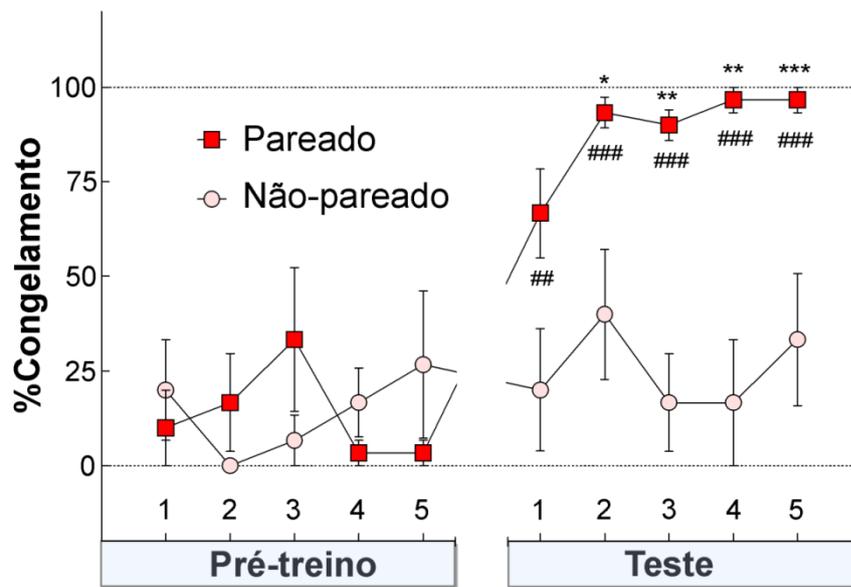


Figura 15 – Porcentagem de comportamento de congelamento durante as apresentações do EC ao longo do condicionamento ao medo. O aprendizado associativo levou ao condicionamento do comportamento de congelamento. Diferenças significativas no teste post hoc de Bonferroni são indicadas por asterisco (inter-grupo: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) ou cerquilha (intra-grupo: ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$). Resultados expressos como média \pm E.P.M., $n=5$ animais por grupo.

5.3 RESULTADOS ELETROFISIOLÓGICOS

Em uma primeira inspeção do registro bruto do LFP (**figura 16 B**), no domínio do tempo, vemos que a apresentação do EC leva a um aumento da amplitude total do LFP registrado no CI. Quando, ainda no domínio do tempo, analisamos o LFP em uma escala temporal menor (**figura 16 A**), vemos que este aumento de amplitude é, na realidade, devido ao aparecimento de uma oscilação neural com amplitude de algumas dezenas de microvolts, sincronizada em frequência e fase à f_m , e que se sobrepõe à atividade oscilatória basal (esta é a própria definição de PEArp, ver *Materiais e métodos*). Ainda na **figura 16 A**, fica clara a relação temporal entre os ciclos da f_m e os ciclos do LFP, que é a fase do sinal.

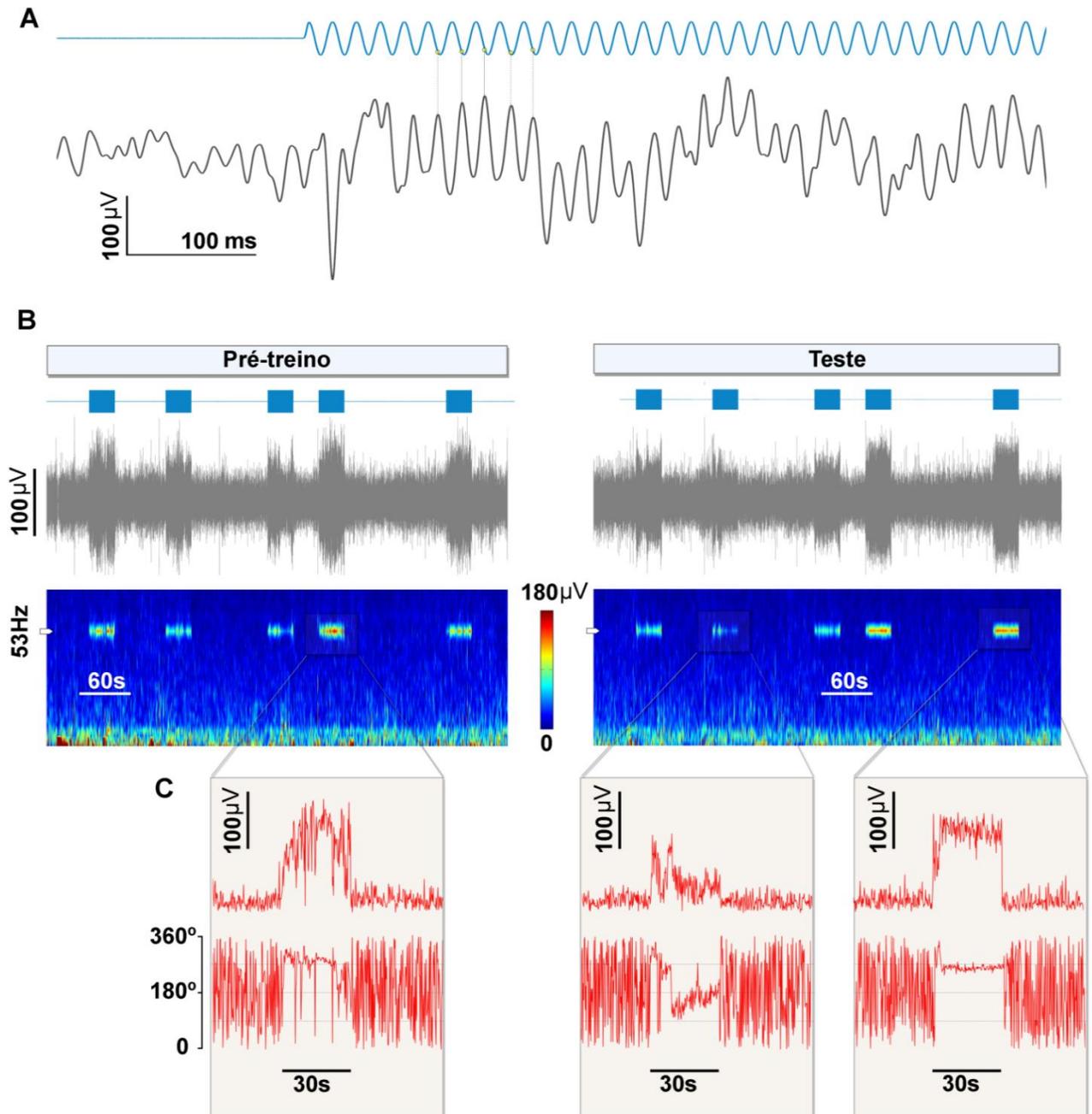


Figura 16 - Registros eletrofisiológicos de um animal do grupo pareado durante o protocolo de condicionamento ao medo. **A.** LFP no CI (cinza) frente à apresentação do quarto EC do pré-treino e onda senoidal com a mesma frequência e fase do EC (azul). Esta escala temporal permite ver que o EC inicialmente induz um PEAt, seguido de uma oscilação neural na mesma frequência f_m e com uma relação de fase fixa em relação a f_m , que é o PEArp propriamente dito. **B.** Registros do mesmo animal em outra escala temporal evidenciando a cada apresentação do EC um aumento da energia total do LFP. A análise tempo-frequência do LFP mostra que este aumento de energia está localizado especificamente em f_m (53,71 Hz). **C.** Trechos da análise tempo-frequência em f_m evidenciando aumento de amplitude e de estabilidade da fase à apresentação do EC.

Podemos ainda analisar os PEArp no domínio da frequência. A análise tempo-frequência na **figura 16 B** é o resultado da transformada de Fourier de tempo reduzido (ver *Materiais e métodos*) do LFP, que gera uma matriz tempo-frequência-amplitude e possibilita a análise de uma faixa de frequência f de interesse ou mesmo de bandas de frequência mais largas. Fica claro neste tipo de análise que o EC leva a um aumento de energia especificamente na banda de frequência em torno de 53,71 Hz. Na **figura 16 C**, vemos algumas janelas com a evolução temporal da amplitude e da fase do LFP em $f = 53,71$ Hz. Na ausência de estimulação auditiva pelo EC, a banda de frequência de f_m no LFP se caracteriza por: 1) baixa amplitude, de acordo com o padrão $1/f$ característico dos sistemas neurais; e 2) variação aleatória dos valores de fase. Ainda na mesma figura, também fica claro que a apresentação do EC, além de levar a um aumento de energia em f_m (traçado superior), também leva a uma estabilização dos valores de fase (traçado inferior).

As análises subsequentes tratarão dos efeitos do aprendizado associativo devido ao condicionamento ao medo tanto em f_m como em bandas de frequência adjacentes do LFP.

5.3.1 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ESPECTRAL DOS LFPs DO CI

Antes de caracterizar as alterações especificamente em f_m , que reflete a atividade de grupos neuronais predominantemente envolvidos no processamento do estímulo auditivo, foi caracterizada a composição espectral do LFP no CI nas bandas de frequências adjacentes, que estão relacionadas à atividade de osciladores endógenos dos quais estes grupos neuronais também participam.

Os valores de energia foram normalizados pelo período basal do pré-treino e são aqui apresentados como uma fração deste valor (**figuras 17 e 18**). No grupo não pareado, os valores de energia ficaram sempre em torno de 01 em todas as bandas de frequência analisadas, durante os períodos de apresentação do EC (**figura 17**) ou nos intervalos entre suas apresentações (**figura 18**). A comparação de médias por meio de RM-ANOVA de um fator não evidenciou nenhuma diferença em relação ao período basal do pré-treino ($p > 0,05$ para todas as comparações). No grupo

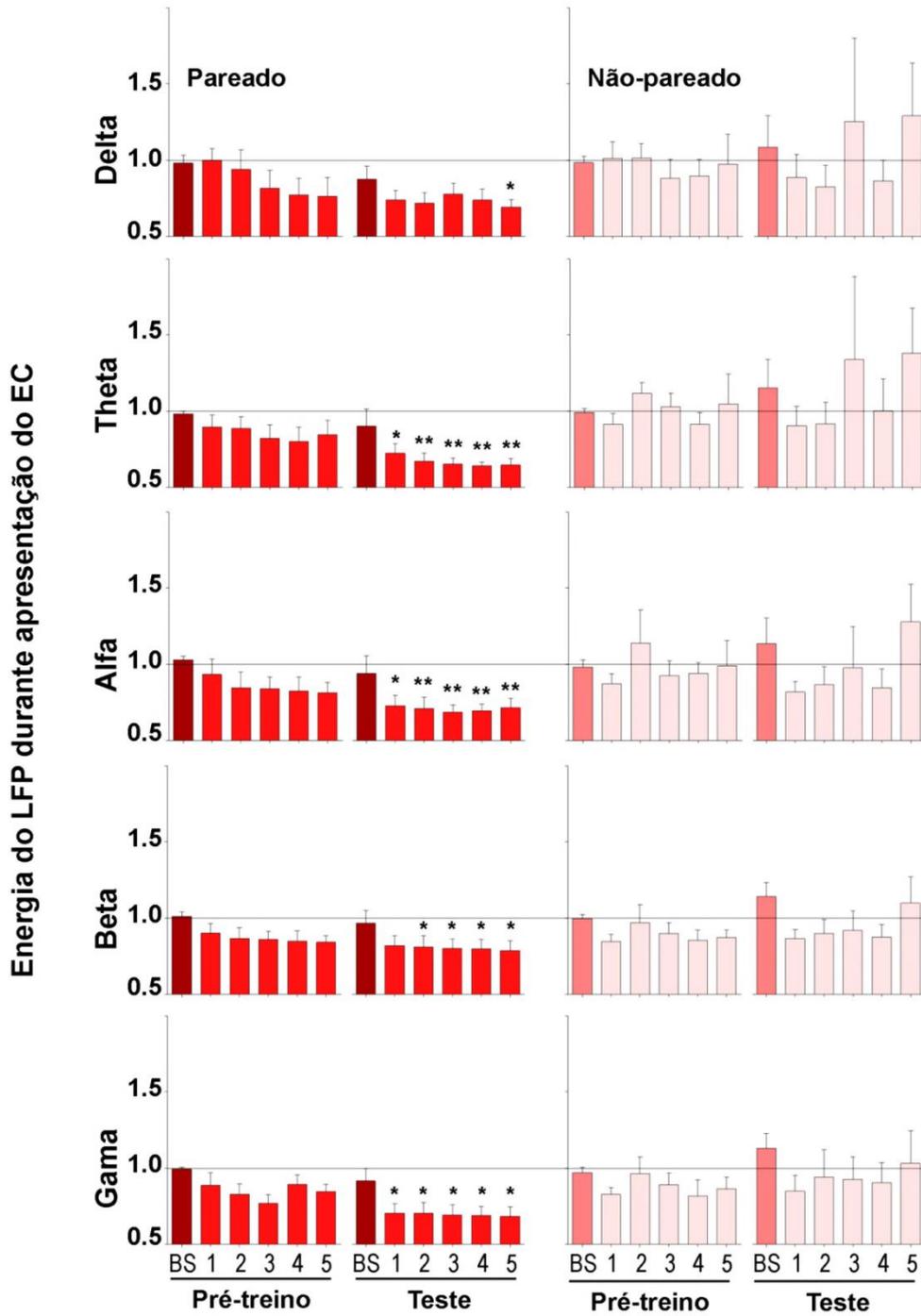


Figura 17 – Composição espectral do LFP durante a apresentação do EC. Os valores normalizados de energia estão representados para os grupos pareado e não pareado no pré-treino e no teste. Os números representam a ordem do EC e BS é o período basal. Diferenças significativas no teste *post hoc* de Dunnet, em comparação com o BS do pré-treino, são indicadas por asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Resultados expressos como média \pm E.P.M., $n=5$ animais por grupo.

pareado, considerando o pré-treino, os valores de energia também se mantiveram em torno de 01 em todas as bandas de frequência, durante os períodos de apresentação do EC e nos intervalos entre suas apresentações. A comparação de médias por meio de RM-ANOVA de um fator também não evidenciou nenhuma diferença em relação ao período basal ($p > 0,05$ para todas as comparações). No período basal do teste, anteriormente à apresentação do EC, também não houve diferença em nenhuma banda de frequência em relação ao período basal do pré-treino, o que era esperado, já que o contexto A não apresenta relevância para o animal. Entretanto, com a exposição ao EC, observou-se uma mudança importante na composição espectral do sinal, com redução de energia nas bandas gama, beta, alfa e teta, e a banda delta apresentando redução somente na quinta apresentação ($p < 0,05$, pós-teste de Dunnet). Estas reduções de energia foram menos consistentes no período entre as apresentações do EC, não se observando diferença em relação ao período basal do pré-treino para as apresentações em nenhuma banda de frequência ($p > 0,05$ para todas as comparações), excetuando-se a banda gama, na qual se observou diferença em todos os períodos ($p < 0,05$, pós-teste de Dunnet).

5.3.2 DESVIOS DE FASE SÃO EVIDENTES LOGO NA REEXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS AO ESTÍMULO CONDICIONADO NO TESTE.

Pelas **figuras 19 e 20**, nas quais estão representados os desvios de fase para cada animal, fica claro que os valores de fase dos grupos pareado e não pareado, no pré-treino, ficam sempre em torno de zero (valor de referência). É notável que, apesar de existir variação inicial entre animais (o que justificou a normalização, ver *Materiais e métodos*), quando consideramos um mesmo animal, a fase permaneça, na maioria das vezes, estável para as cinco apresentações do EC no pré-treino. Entretanto, ainda no pré-treino, encontramos alguns desvios da linha de base. Estes dois desvios correspondem à quinta apresentação do EC para dois animais: o animal R03 do grupo não pareado e o animal R05 do grupo pareado. Estes desvios de nenhuma forma podem explicar-se por uma possível aversividade do EC aos animais. Muito pelo contrário, os animais encontravam-se extremamente

confortáveis com o EC, já que nessas apresentações apresentaram percentuais de congelamento igual a zero.

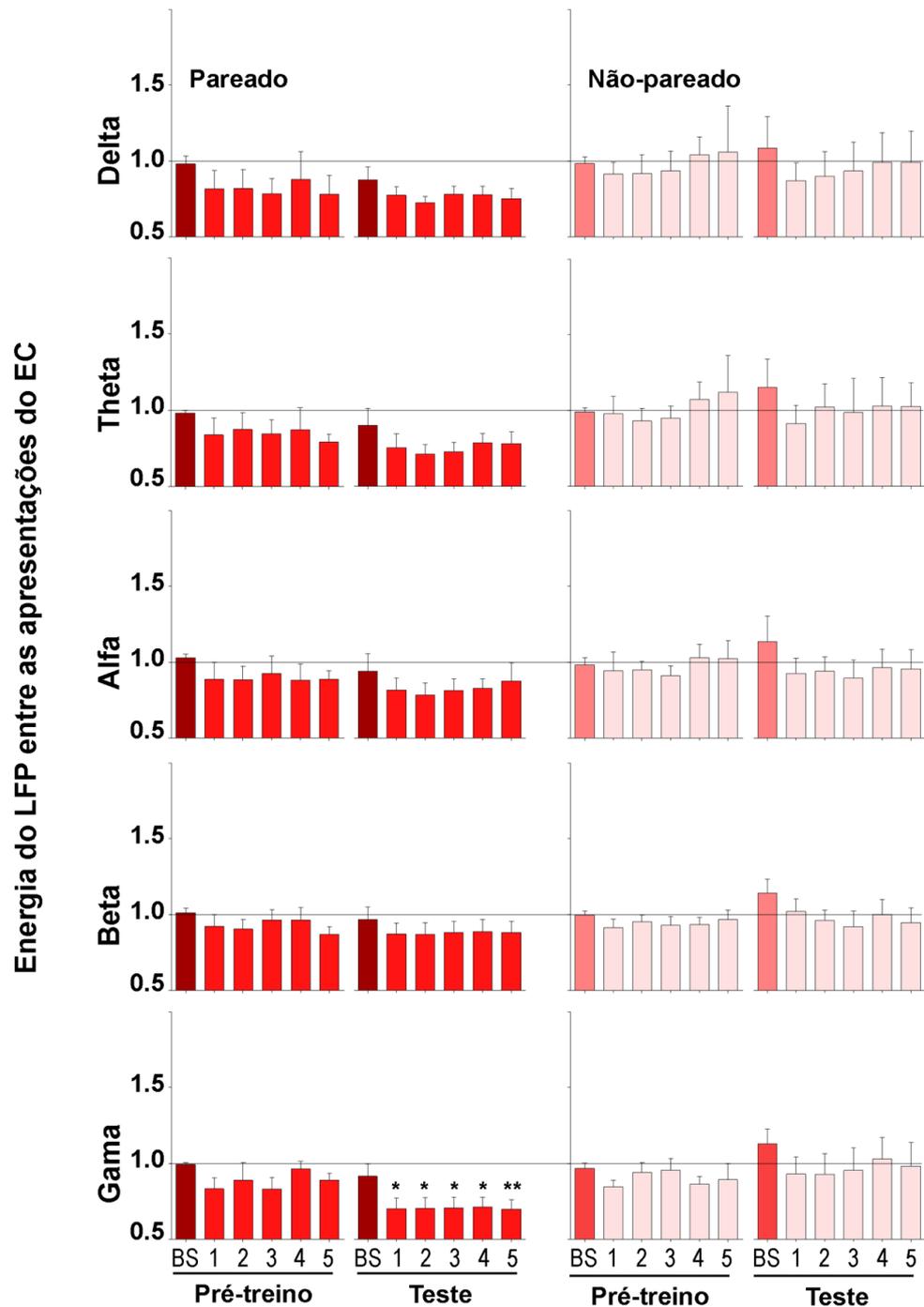


Figura 18 – Composição espectral do LFP entre as apresentações do EC. Os valores normalizados de energia estão representados para os grupos pareado e não pareado no pré-treino e no teste. Os números representam a ordem do EC e BS é o período basal. Diferenças significativas no teste *post hoc* de Dunnet, em comparação com o BS do pré-treino, são indicadas por asterisco (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Resultados expressos como média \pm E.P.M., $n=5$ animais por grupo.

Os animais do grupo pareado apresentaram desvios de fase importantes no teste, mas nem todos animais do grupo tiveram desvios de fase na mesma apresentação do EC no teste. No entanto, por esta mesma figura é possível detectar um padrão de evolução temporal dos desvios de fase neste grupo ao longo das apresentações do EC. Os maiores desvios acontecem nas primeiras apresentações do EC, enquanto que nas últimas apresentações os desvios são mínimos. Para ter uma ideia clara deste padrão, foi feito um ranking dos desvios de fase para ambos os grupos (ver **figura 21B**). No grupo pareado, os maiores desvios se concentraram nas duas primeiras apresentações (três animais na primeira e dois na segunda), ao passo que os menores desvios se concentraram nas duas últimas apresentações (um animal na quarta e todos outros na quinta). A aplicação do teste não-paramétrico de Friedman, encontrou diferença significativa entre a posição do maior e do menor desvio de fase no grupo pareado (diferença na soma de ranks= -17.0, $p < 0,05$), mas não em nenhuma outra comparação ($p > 0,05$).

O grupo não pareado também apresentou desvios de fase importantes, muito embora os momentos em que ocorrem os maiores e os menores desvios durante o teste não apresentem um padrão temporal bem definido, como no grupo pareado. Na **figura 21B** fica claro que a distribuição dos desvios neste grupo apresenta um padrão bastante aleatório. O teste de Friedman neste caso, não encontrou nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) entre os rankings de desvio.

Os resultados apresentados nas **figuras 19 e 20** consideraram o valor médio de fase para cada apresentação de 30 segundos do EC (ver *Materiais e Métodos*), obtido por meio do cálculo da média circular dos valores de fase de janelas espectrais sequenciais. No entanto, a detecção da resposta com base em técnicas de análise tempo-frequência com janelas móveis no tempo também permite o estudo da evolução temporal desta variável ao longo dos 30 segundos de estimulação. Este tipo de análise é importante, pois permite avaliar se os desvios de fase são um fenômeno fisiológico consistente ao longo do tempo quando consideramos o grupo de animais.

Na **figura 21A** é possível observar a evolução temporal da média dos valores de fase para ambos os grupos. Na primeira apresentação do pré-treino, de acordo com os valores médios já apresentados anteriormente, os desvios de fase dos

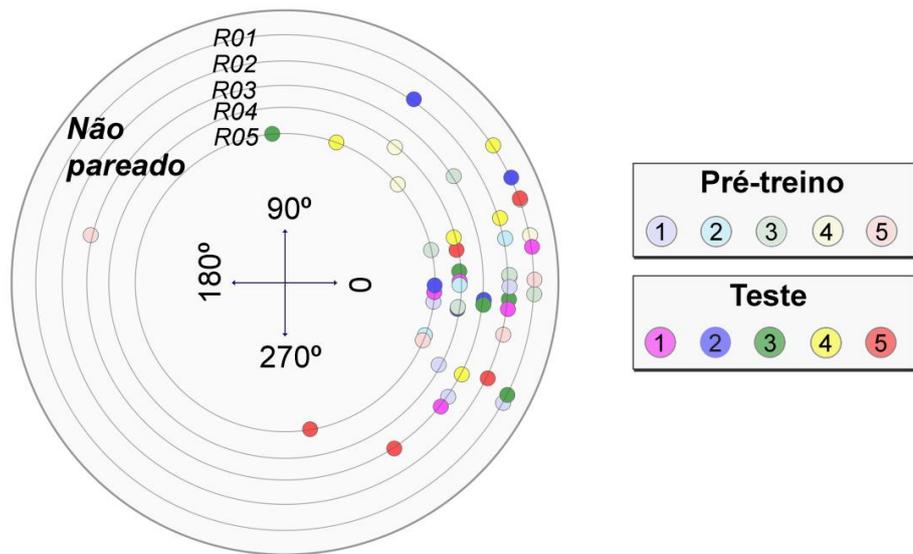


Figura 19 - Desvio de fase para cada apresentação do EC durante o condicionamento ao medo para os animais do grupo não-pareado. O grupo não pareado não apresentou um padrão consistente de desvio de fase após o condicionamento ao medo. Os valores de fase para cada apresentação do EC estão representados como desvio em graus em relação aos valores da linha de base, desconsiderando os valores de amplitude. Cada círculo concêntrico representa um animal.

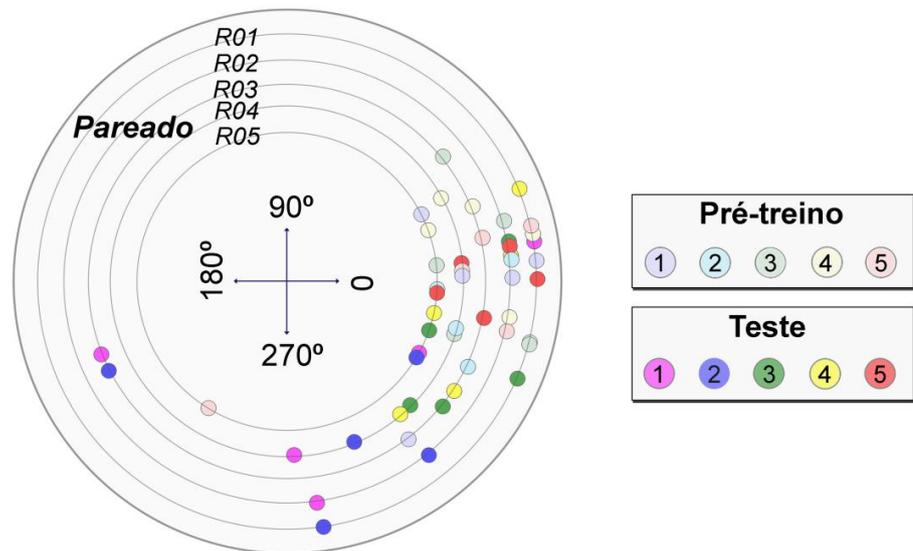


Figura 20 – Desvio de fase para cada apresentação do EC durante o condicionamento ao medo para os animais do grupo pareado. Os valores de fase para cada apresentação do EC estão representados como desvio em graus em relação aos valores da linha de base, desconsiderando os valores de amplitude. Cada círculo concêntrico representa um animal. O desvio é evidente no grupo pareado logo que os animais são re-expostos ao EC no teste (rosa e roxo), mas estes valores retornam à linha de base nas exposições subsequentes do EC (vermelho). O grupo não pareado não apresentou um padrão consistente de desvio.

grupos pareado e não pareado oscilaram em torno de zero durante os 30 segundos de estimulação. Quando se considera o maior desvio de fase para cada animal do grupo não pareado, e realiza-se a média de grupo destes valores, o que se obtém é uma curva temporal que oscila também em torno de zero. Este é um resultado importante, pois mostra que mesmo que o grupo pareado apresente desvios de fase, este fenômeno, é pouco consistente quando se considera a média do grupo durante a apresentação do EC. No grupo pareado, a média de grupo para os maiores desvios de fase do ranking mostra que, durante os primeiros 10 segundos da apresentação do EC, os valores de fase oscilam em torno de zero. No entanto, com o passar do tempo, estes valores tendem, progressivamente, a adquirir um valor estável em torno de -100° e assim se mantêm durante toda a apresentação do EC. Portanto, os desvios de fase do grupo pareado, apresentados anteriormente como valores médios para cada apresentação do EC, de fato apresentam um padrão consistente dentro do período da apresentação do EC, com desvios estáveis nos dois terços finais da apresentação do som. Quando se consideram os menores desvios de fase, observa-se que no grupo pareado os valores de grupo, durante os 30 segundos da apresentação do som, permanecem extremamente fixos em torno do valor de referência. O grupo não pareado, no entanto, continua apresentando alta variação em torno da linha de base, não diferindo das outras duas situações consideradas. Esta variável será quantificada posteriormente pelo índice denominado fator de agrupamento de fase.

Quando se recalculam as médias circulares para o primeiro EC do pré-treino e os ECs com maior e menor desvio do teste, mas dividindo os períodos de apresentação do som em três blocos de 10 segundos, observa-se que desvios de fase estatisticamente diferentes dos valores do pré-treino só são, de fato, observados nos dois terços finais do maior desvio do grupo pareado (RM-ANOVA de um fator, comparação com o primeiro bloco do pré-treino, $p < 0,05$, pós-teste de Dunnet). No grupo não pareado, não houve diferença significativa em relação ao pré-treino para nenhum bloco considerado (RM-ANOVA de um fator, comparação com o primeiro bloco do pré-treino, $p > 0,05$, pós-teste de Dunnet), mesmo nos blocos que consideraram os maiores desvios de fase.

Na **figura 21D**, as amplitudes dos mesmos sinais considerados para a análise de fase foram também divididos em blocos de 10 segundos que correspondem aos

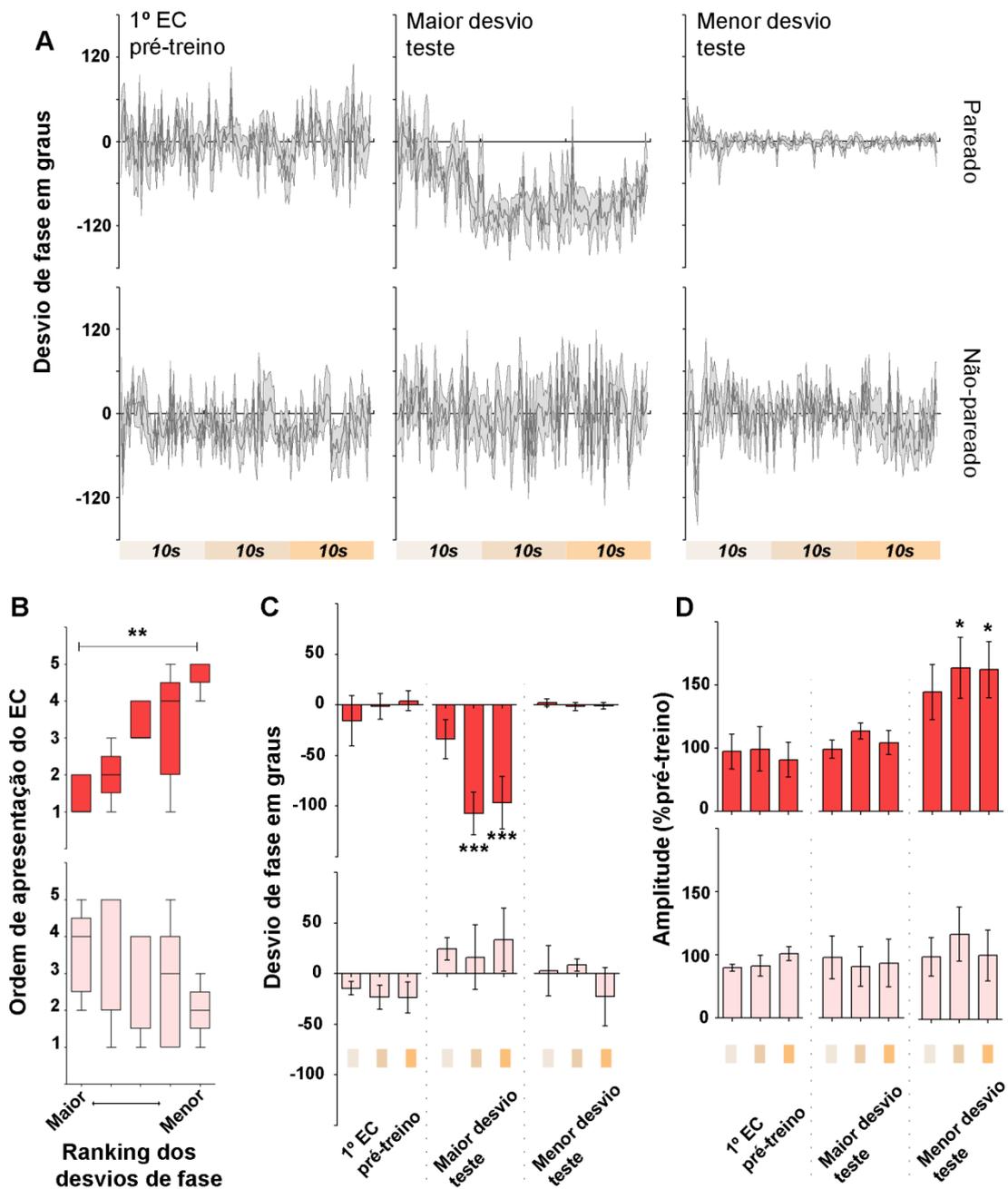


Figura 21 – Evolução temporal dos desvios de fase dentro da apresentação do EC. A. Média \pm E.P.M. para os valores de fase ao longo dos 30s do EC. No pré-treino ambos os grupos tiveram valores de fase que oscilam em torno de zero. O grupo não pareado manteve o mesmo padrão no teste. O grupo pareado apresentou desvios consistentes a partir de 10 segundos. B. Boxplot do ranking dos desvios de fase no teste, representando mínimo, máximo e quartis (n=5 por grupo). Diferenças significativas no teste de *post hoc* de Dunn são indicadas por asterisco (** $p < 0,01$). C e D. Média \pm E.P.M. (n=5 por grupo) da fase e amplitude dos blocos de 10 segundos indicados em A. Diferenças significativas no teste *post hoc* de Dunnet, em comparação com o primeiro bloco do pré-treino, são indicadas por asterisco (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

momentos da **figura 21C**. Os valores de amplitude do grupo não pareado permanecem constantes durante todos os momentos considerados (RM-ANOVA de um fator, comparação com o primeiro bloco do pré-treino, $p > 0,05$, pós-teste de Dunnet). No grupo pareado, os blocos da primeira apresentação do pré-treino e do maior desvio de fase do teste não apresentaram nenhuma alteração na amplitude (RM-ANOVA de um fator, comparação com o primeiro bloco do pré-treino, $p > 0,05$, pós-teste de Dunnet). No entanto, nos blocos em que houve o menor desvio de fase, houve aumento da amplitude do PEArp no grupo pareado (RM-ANOVA de um fator, comparação com o primeiro bloco do pré-treino, $p < 0,05$, pós-teste de Dunnet).

Quando se consideram as médias de grupo são calculadas organizando os valores de fase somente pela sua ordem de apresentação no pré-treino e no teste, os resultados obtidos são semelhantes. A comparação de médias dos valores de fase entre dez apresentações do EC nos dois grupos por meio de RM-ANOVA de dois fatores (grupo e ordem do EC) evidenciou uma interação grupo-ordem significativa ($F_{9,72} = 2,430$, $p < 0.05$).

No pré-treino, a fase permaneceu em torno de zero para todas as apresentações do EC e não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$, pós teste de Bonferroni). Como os valores de fase foram obtidos por meio de uma normalização, esta variação em torno de zero era, de fato, esperada e confirma que esta uma variável com distribuição gaussiana (ver **figura 22** e **tabela 03**). O fato de não haver diferença entre os grupos vai de encontro aos resultados comportamentais e reforça que a valência do EC era inicialmente neutra para os animais. Como já mencionado anteriormente, um animal do grupo pareado e outro do não pareado apresentaram desvios de fase no quinto EC do pré-treino. É possível evidenciar estes desvios como aumento no E.P.M para ambos os grupos. No entanto, estes desvios não constituíram um fator determinante para deslocar a média do grupo, da maneira como ocorreu como efeito do aprendizado associativo no grupo pareado.

Logo na re-exposição ao EC no teste, os animais do grupo pareado apresentaram um desvio de fase significativo em relação aos valores do pré-treino, sendo que o desvio médio foi de $-69,6^\circ$ para a primeira apresentação e de $-76,9^\circ$ para a segunda apresentação ($p < 0,05$ para EC1 e $p < 0,01$ para EC2, pós-teste de Bonferroni). Apesar de ser evidente que os valores de fase para a primeira

Pré - Treino					
	EC 1	EC 2	EC 3	EC 4	EC 5
Pareado	-3,7 ± 13,2	-10,6 ± 5,4	5,7 ± 10,4	14,55 ± 6,6	-21,1 ± 25,6
Não-pareado	-20,2 ± 6,7	9,0 ± 7,0	-1,3 ± 6,5	-19,9 ± 11,1	24,4 ± 35,7

Teste					
	EC 1	EC 2	EC 3	EC 4	EC 5
Pareado	-69,6 ± 28,5	-76,9 ± 20,9	-23,3 ± 9,7	-13,4 ± 13,0	0,1 ± 3,5
Não-pareado	-10,0 ± 7,8	14,8 ± 11,3	12,1 ± 21,3	21,5 ± 15,7	-26,4 ± 19,2

Tabela 3 – Desvio de fase em relação à linha de base, medido em graus. Média ± E.P.M., n = 5 animais por grupo.

apresentação do grupo pareado têm um desvio importante em relação aos valores basais (ver **figura 22**), o animal R01 deste grupo não apresentou desvio de fase nesta apresentação, o que fez com que a comparação inter-grupo não fosse significativa. A diferença em relação ao grupo não-pareado somente foi significativa na segunda apresentação do EC, quando a fase do grupo pareado apresentou um desvio médio de $-76,9^\circ$ e a do grupo não pareado de $14,8^\circ$ ($p < 0,01$, pós-teste de Bonferroni). Após este desvio inicial, os valores de fase do grupo pareado gradativamente retornaram aos valores basais nas três apresentações subsequentes do EC, sendo que nestas apresentações não houve mais diferenças significativas nas comparações intra-grupo ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) ou inter-grupo ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni). Em contrapartida, o grupo não pareado não apresentou desvios de fase nas comparações intra-grupo ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) após o condicionamento ao medo. Como vemos pela **figura 19**, para todas as apresentações do EC no teste, os valores de fase para este grupo oscilam em torno dos valores basais, apresentando o mesmo padrão do pré-treino. Estes são resultados importantes, pois a diferenciação eletrofisiológica entre os grupos no teste, juntamente com o fato de não haver diferença entre eles no pré-treino, confirma que a fase do PEArp é, de fato, uma resposta condicionada. Entretanto há

uma diferença fundamental em relação à clássica resposta condicionada comportamental descrita anteriormente. Comparando as **figuras 15 e 22**, e

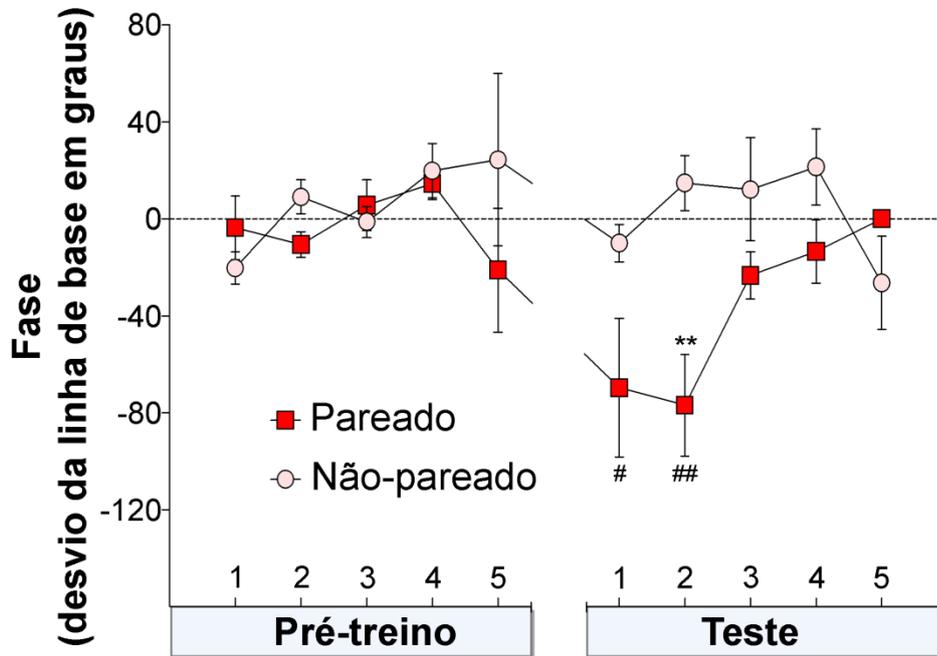


Figura 22 – Desvios de fase do PEArp ao longo do condicionamento ao medo. O aprendizado associativo leva a um desvio dos valores de fase dos PEArp na re-exposição ao EC no teste. Os valores estão em torno de zero no pré-treino. No grupo pareado, há desvio da linha de base logo na re-exposição ao EC após o treino e nas exposições subsequentes a fase tende a retornar aos valores basais. No grupo não-pareado, os valores de fase continuam em torno de zero no teste. Diferenças significativas no teste *post hoc* de Bonferroni são indicadas por asterisco (inter-grupo: ** $p < 0.01$) ou cerquilha (intra-grupo: # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$). Resultados expressos como média \pm E.P.M., $n=5$ animais por grupo.

considerando em qual apresentação do EC as respostas apresentam desvio dos valores basais, fica claro que a fase do PEArp e a resposta comportamental têm dinâmicas temporais distintas no teste. O desvio de fase do PEArp aparece simultaneamente com a resposta condicionada comportamental (EC1 e EC2 do teste), mas enquanto o comportamento de congelamento permanece em torno de 100% nas três apresentações subsequentes do EC, os valores de fase por sua vez tendem a retornar aos valores basais nestas três apresentações. Como veremos adiante, outras variáveis eletrofisiológicas apresentam ainda um terceiro padrão de dinâmica temporal, se tornando evidentes somente nas últimas apresentações do EC no teste.

5.3.3 O AUMENTO DO FATOR DE AGRUPAMENTO DE FASE OCORRE APÓS O DESVIO DE FASE E ACOMPANHA O RETORNO DA FASE AOS VALORES BASAIS.

Após este desvio de fase nas primeiras apresentações do EC no teste, a fase do grupo pareado retornou aos seus valores basais do pré-treino à medida que os animais foram expostos repetidamente ao EC. O retorno aos valores iniciais do pré-treino coincidiu com um segundo fenômeno: o aumento da estabilidade de fase em torno dos valores basais (ver **figura 21 e figura 23**). A estabilidade da fase durante os 30 segundos da apresentação do EC é medido pelo PLF (ver *Materiais e métodos*). A comparação de médias do PLF para as dez apresentações do EC nos dois grupos foi feita por meio de RM-ANOVA de dois fatores (grupo e ordem do EC), que evidenciou uma interação grupo-ordem significativa ($F_{9,72} = 2.604$, $p < 0.05$). Não houve diferença entre os valores de PLF do grupo pareado e do grupo não-pareado no pré-treino ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni), que tiveram valores médios em torno de 0,6 (ver **figura 25 e tabela 04**).

No teste, não houve diferença significativa na comparação intra-grupo ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) ou na comparação inter-grupo (ver **figuras 23, 24 e 25**, $p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) dos valores de PLF para a primeira, a segunda e a terceira apresentações do EC. Na quarta e quinta apresentação do EC no teste os valores médios de PLF para o grupo pareado foram 0,93 e 0,94, respectivamente, sendo estatisticamente maiores que os valores do pré-treino ($p < 0,01$ para EC4 e EC5, pós-teste de Bonferroni). A diferença em relação ao grupo não-pareado também foi significativa para EC5 (ver **figura 25 e tabela 04**), quando o valor médio do PLF para o grupo não-pareado foi 0,50 ($p < 0,01$, pós-teste de Bonferroni). O grupo não-pareado, também para o PLF, não apresentou diferenças significativas nas comparações intra-grupo ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) ou inter- grupo ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) após o condicionamento ao medo, mais uma vez indicando que o aumento da estabilidade de fase é um efeito do pareamento temporal entre EC e ENC no treino, e conseqüente ao aprendizado associativo.

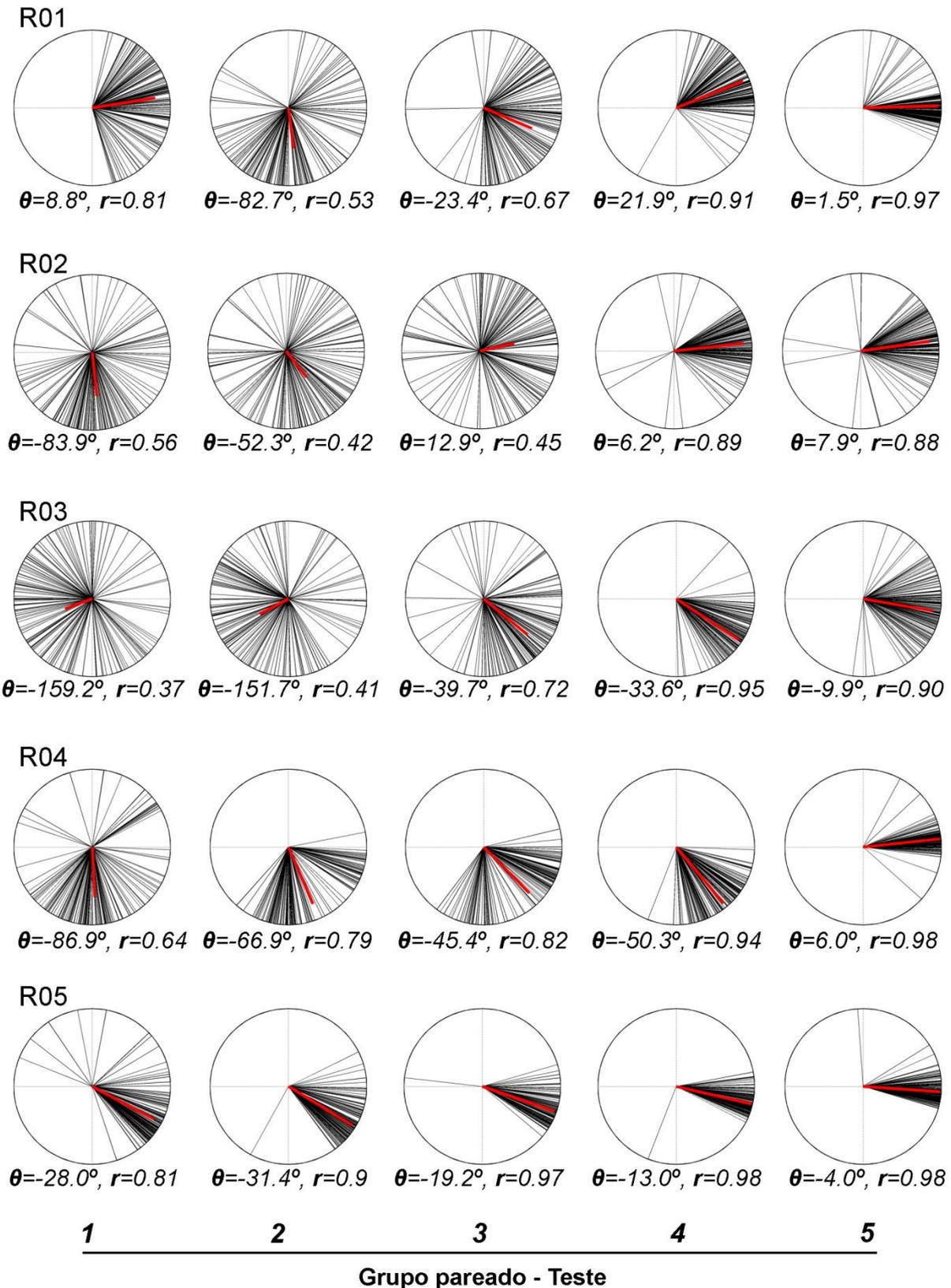


Figura 23 – Desvios de fase do grupo pareado no teste. Os valores de cada janela espectral estão representados em preto e o vetor resultante de todas as janelas em vermelho. θ e r são respectivamente o ângulo e o comprimento do vetor resultante ($r = \text{PLF}$).

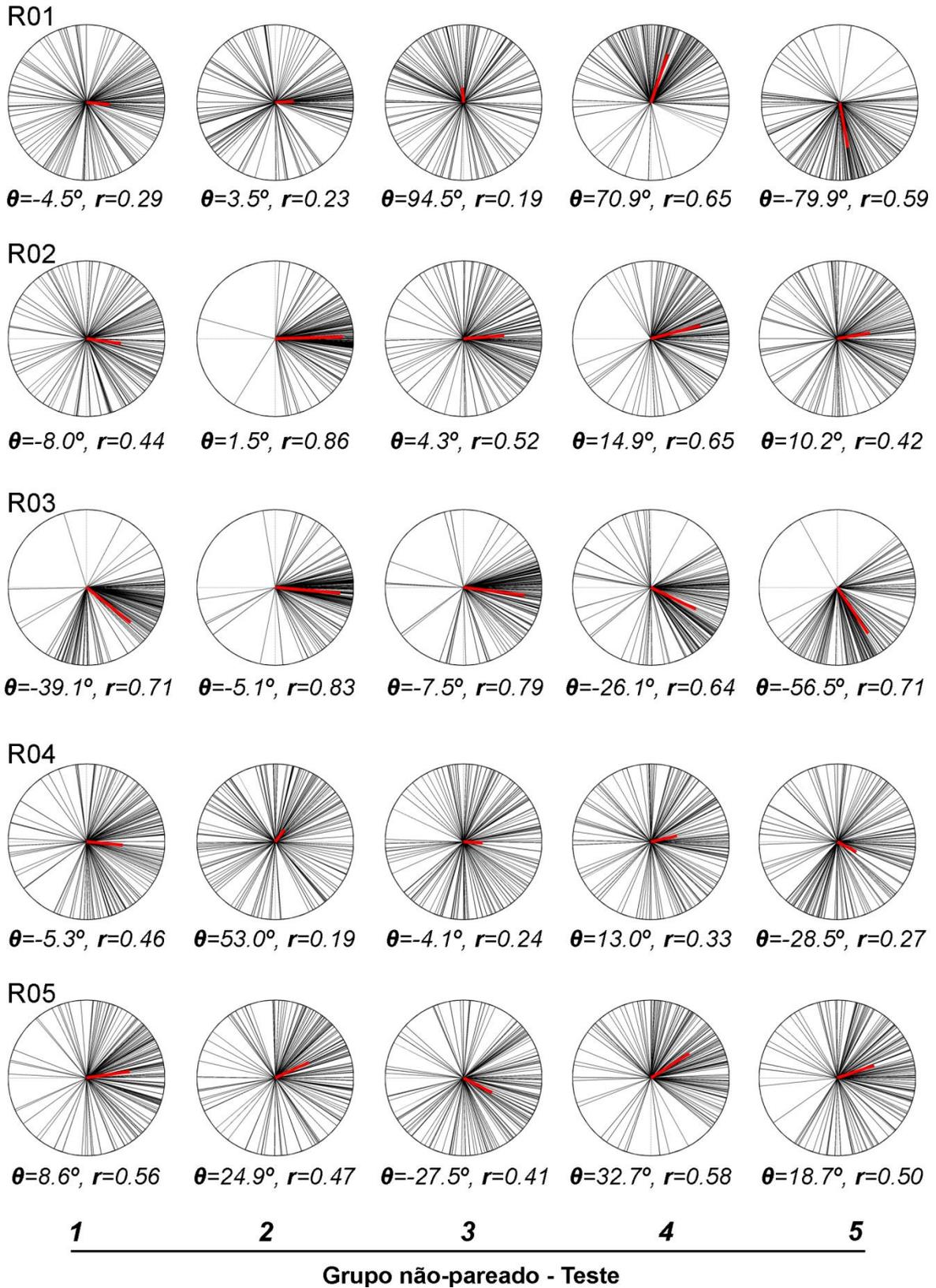


Figura 24 – Desvios de fase do grupo não pareado no teste. Os valores de cada janela espectral estão representados em preto e o vetor resultante de todas as janelas em vermelho. θ e r são respectivamente o ângulo e o comprimento do vetor resultante ($r = PLF$).

Pré - Treino					
	EC 1	EC 2	EC 3	EC 4	EC 5
Pareado	0,63 ± 0,11	0,61 ± 0,10	0,68 ± 0,10	0,58 ± 0,11	0,66 ± 0,06
Não-pareado	0,61 ± 0,09	0,57 ± 0,08	0,52 ± 0,05	0,61 ± 0,11	0,59 ± 0,08

Teste					
	EC 1	EC 2	EC 3	EC 4	EC 5
Pareado	0,66 ± 0,09	0,62 ± 0,11	0,73 ± 0,08	0,93 ± 0,02	0,94 ± 0,02
Não-pareado	0,49 ± 0,07	0,52 ± 0,14	0,43 ± 0,10	0,57 ± 0,06	0,50 ± 0,07

Tabela 4 – Valores do fator de agrupamento de fase (PLF). O PLF é um valor adimensional variando entre 0 e 1. Média ± E.P.M., n = 5 animais por grupo.

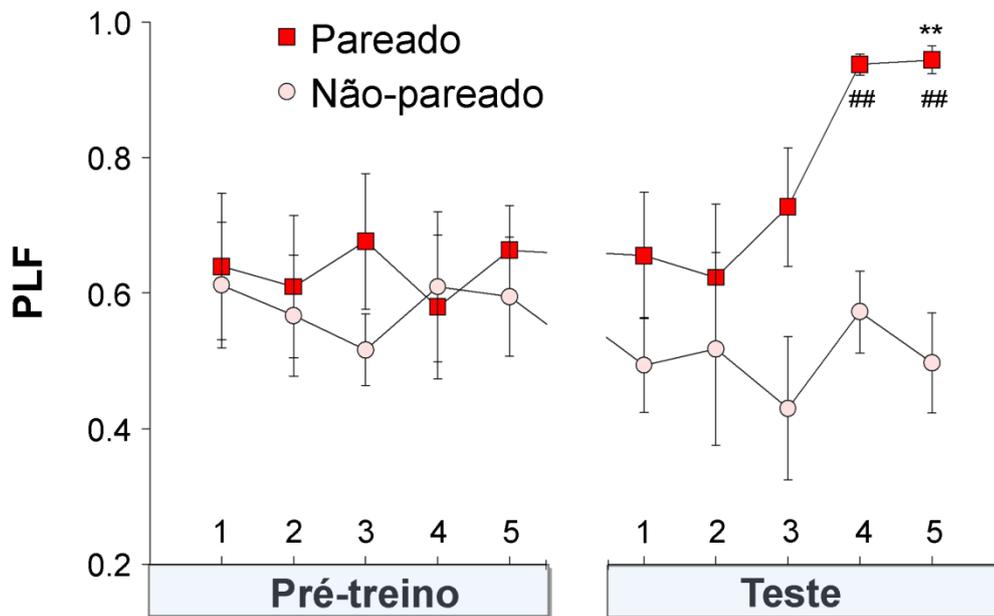


Figura 25 – Valores do fator de PLF de fase dos PEArp ao longo do condicionamento ao medo. O aprendizado associativo leva ao aumento do PLF dos PEArp na quarta e quinta apresentação do EC no teste. No grupo não-pareado não houve aumento após o condicionamento. Diferenças significativas no teste *post hoc* de Bonferroni são indicadas por asterisco (inter-grupo: ** $p < 0.01$) ou cerquilha (intra-grupo: ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$). Resultados expressos como média ± E.P.M., n=5 animais por grupo.

5.3.4 O AUMENTO DA AMPLITUDE DAS RESPOSTAS EVOCADAS OCORRE SIMULTANEAMENTE AO AUMENTO DO PLF.

Os valores de amplitude normalizados foram expressos como porcentagem de variação em relação aos valores do pré-treino. A amplitude dos PEArp também apresentou aumento como efeito do treino pareado. A comparação de médias da amplitude nas dez apresentações do EC nos dois grupos por meio de RM-ANOVA de dois fatores (grupo e ordem do EC) evidenciou uma interação grupo-ordem significativa ($F_{9,72} = 3.284, p < 0.05$). Comparando os valores de amplitude no pré-treino, não houve diferença significativa entre o grupo pareado e o grupo não-pareado para nenhuma das apresentações do EC ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni). Para todas as cinco apresentações do EC os valores de amplitude ficaram em torno de 100% (ver **figura 26**).

Na primeira, segunda, terceira e quarta apresentações do EC no teste não houve diferença significativa na comparação intra-grupo ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) ou na comparação inter-grupo ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) dos valores de amplitude (ver **figura 26**). Somente na quinta apresentação do EC no teste, quando o valor médio de amplitude do grupo pareado foi de 153,4% e o do grupo não-pareado foi de 85,0%, houve diferença significativa na comparação inter-grupo ($p < 0,01$, pós-teste de Bonferroni). A diferença em relação ao pré-treino também foi significativa somente para a quinta apresentação do EC (ver **figura 13** e **tabela 03**), ($p < 0,01$, pós-teste de Bonferroni). O grupo não-pareado, por sua vez, não apresentou aumentos significativos de amplitude nas comparações intra-grupo ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) ou inter-grupo ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni) após o condicionamento ao medo.

Comparando a **figura 25** e a **figura 26**, vemos que o aumento do PLF e o aumento de amplitude no grupo pareado são eventos simultâneos no dia teste, ocorrendo somente tardiamente na sequência de apresentações do EC. É evidente na comparação entre as **figuras 22, 25 e 26** que o desvio do valor absoluto de fase atinge seus níveis máximos nas primeiras apresentações do EC no teste, quando o PLF e a amplitude apresentam valores iguais aos do pré-treino. Somente depois de repetidas exposições ao EC, PLF e amplitude demonstram aumentos significativos

no grupo pareado, o que curiosamente coincide com o retorno da fase aos valores basais. É notável também o fato não haver correlação entre os desvios de fase, os aumentos de PLF e os aumentos de amplitude com o aumento da imobilidade do animal, já que o porcentual de congelamento é estatisticamente igual para a segunda, a terceira, a quarta e a quinta apresentações do EC (comparar **figuras 15 e 26**) e claramente não acompanha a variação entre as apresentações do EC que demonstraram as variáveis eletrofisiológicas. Para todas as quatro variáveis analisadas no trabalho, o condicionamento ao medo não-pareado funcionou perfeitamente como controle do aprendizado associativo, não levando a alterações em nenhuma destas variáveis para nenhuma das apresentações do EC no teste. Este resultado coloca as alterações encontradas no grupo pareado como causadas especificamente pelo aprendizado associativo relacionado ao condicionamento ao medo.

Pré - Treino					
	EC 1	EC 2	EC 3	EC 4	EC 5
Pareado	105,6 ± 6,4	93,3 ± 7,1	103,8 ± 9,6	103,0 ± 6,1	94,3 ± 7,7
Não-pareado	93,7 ± 4,9	99,3 ± 4,4	100,6 ± 5,7	103,2 ± 2,9	103,2 ± 5,6

Teste					
	EC 1	EC 2	EC 3	EC 4	EC 5
Pareado	97,9 ± 9,2	83,3 ± 15,3	100,3 ± 15,3	137,9 ± 11,1	153,4 ± 22,7
Não-pareado	92,0 ± 14,6	110,3 ± 16,6	96,5 ± 17,0	95,6 ± 14,4	85,0 ± 15,4

Tabela 5 – Amplitude dos PEArp normalizada a partir dos valores do pré-treino. Média ± E.P.M., n = 5 animais por grupo.

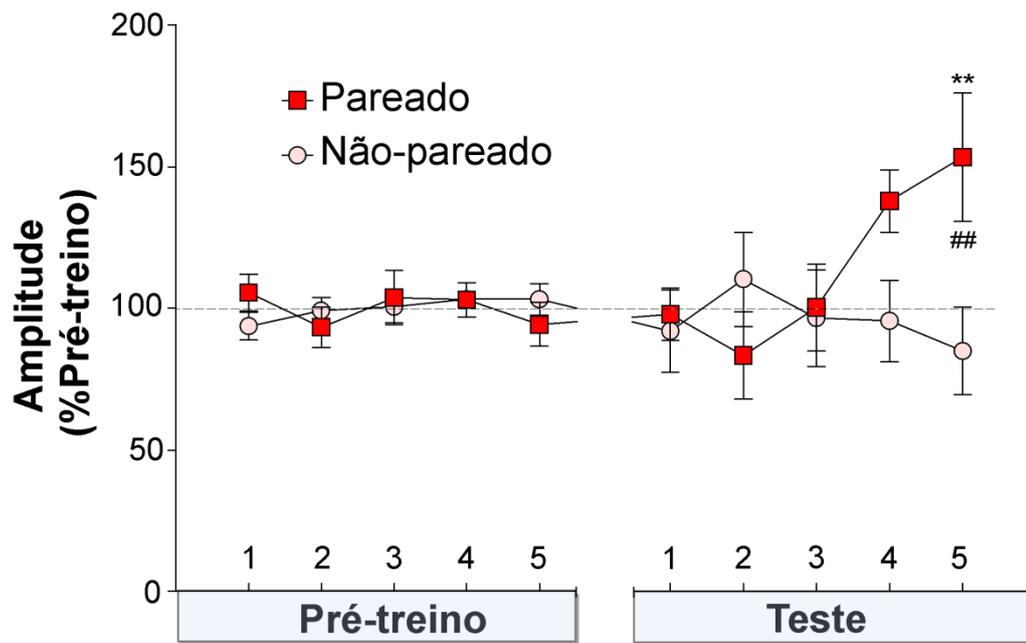


Figura 26 – Amplitude dos PEArp ao longo do condicionamento ao medo. O aprendizado associativo leva a um aumento de amplitude dos PEArp no CI na quinta apresentação do EC no teste. O treino não-pareado não leva a aumento de amplitude no teste. Diferenças significativas no teste *post hoc* de Bonferroni são indicadas por asterisco (intergrupo ** $p < 0.01$) ou cerquilha (intra-grupo: ## $p < 0.01$). Resultados expressos como média \pm E.P.M., $n=5$ animais por grupo.

6 DISCUSSÃO

6.1 RESPOSTAS CONDICIONADAS COMPORTAMENTAIS

No pré-treino, os níveis de congelamento para ambos os grupos foi igual e após o condicionamento ao medo, o grupo pareado mostrou aumento no comportamento de congelamento em relação aos seus valores do pré-treino e em relação ao grupo não pareado. Esta distinção com relação ao comportamento de congelamento é classicamente utilizada na literatura como certificação de que o protocolo de condicionamento foi efetivo em levar ao aprendizado associativo. Como os animais foram sorteados para os seus grupos experimentais um dia antes início do protocolo, este resultado é um importante controle que evidencia que não há viés comportamental nos grupos antes do treino.

A ausência desta diferenciação comportamental entre grupos é uma das críticas a trabalhos recentes que avaliaram plasticidade no CI de morcegos em experimentos de condicionamento ao medo. Apesar de terem mostrado consistentemente que o condicionamento ao medo auditivo induz deslocamentos na curva de sintonia de neurônios no CI, os animais usados nestes experimentos eram contidos durante a apresentação do EC, o que certamente gerava um contexto aversivo para os animais. De fato, nestes trabalhos, os animais que foram treinados em um padrão não pareado também apresentaram plasticidade na resposta ao EC no CI, apesar de esta plasticidade se evidenciar não como mudanças na curva de sintonia, e sim como aumento na frequência de disparo dos neurônios em resposta ao som (Ji e Suga, 2009). Portanto, é difícil afirmar neste caso que a alteração na resposta CI não reflita um componente contextual mais geral e de caráter aversivo. Neste caso, a resposta aos estímulos sensoriais de qualquer natureza, sejam eles condicionados ou não, estaria alterado. Este foi precisamente o resultado encontrado em um trabalho da década de 60 avaliando também os efeitos do condicionamento ao medo respostas evocadas auditivas em ratos. Após o condicionamento ao medo a amplitude das respostas evocadas no CI de fato aumentava, entretanto, aumentava também em um grupo controle em que se usou como EC um estímulo fótico. A conclusão do autor é que, pela falta de especificidade desta plasticidade, o aumento observado não poderia dever-se ao

aprendizado de uma propriedade do EC, mas sim a um estado de alerta aumentado do animal, em resposta a um contexto aversivo (Mark e Hall, 1967).

Nos experimentos descritos neste trabalho, houve o máximo de cuidado em minimizar a aversividade do contexto A, no qual os animais foram expostos ao EC no pré-treino e no teste, e em criar condições explícitas para que os animais o diferenciassem do contexto B, em que ocorria a apresentação do ENC (ver *Materiais e métodos*). O fato de o grupo não-pareado ter apresentado a resposta comportamental esperada de um controle, com taxas de congelamento igualmente baixas tanto no pré-treino como no teste, mostra que o protocolo comportamental usado foi efetivo em atribuir uma valência neutra ao contexto A. Este resultado mostra também que todo o procedimento de manipulação e fixação do capacete de registro não foi um fator estressante para os animais, que provavelmente já se encontravam bem adaptados aos experimentador 01. Isto nos leva naturalmente a concluir que as alterações comportamentais e eletrofisiológicas observadas no grupo pareado não decorrem de uma associação inespecífica do EC com um contexto aversivo, como no caso dos trabalhos citados acima, mas necessariamente dependem do pareamento temporal entre o EC e o ENC no treino, e podem ser totalmente atribuídas ao aprendizado de uma propriedade do EC: seu caráter preditor de um evento aversivo.

Ainda com relação aos resultados comportamentais, é notável que logo na segunda apresentação do EC no teste, quando primeiramente se diferenciaram comportamentalmente os grupos, o nível de congelamento do grupo pareado atingiu níveis bastante altos e estes valores se mantiveram igualmente altos também na terceira, na quarta e na quinta apresentação do EC. Como é evidente quando se comparam os gráficos dos resultados, este padrão de saturação, logo nas primeiras apresentações do EC após o treino, é uma diferença importante entre o padrão das respostas condicionadas comportamentais e das respostas condicionadas eletrofisiológicas, que são sensíveis à ordem de apresentação do EC no teste. Este resultado está em consonância com resultados prévios da literatura que mostram que as respostas comportamentais se evidenciam nas primeiras apresentações do EC no teste, ao mesmo tempo em que se evidenciam também alterações plásticas em estruturas associativas, e requerem várias apresentações do EC para se extinguirem. Neste trabalho, como o EC foi apresentado somente cinco vezes no

treino, e a resposta de congelamento não foi avaliada em dias subsequentes, não foi possível evidenciar a extinção da resposta comportamental.

6.2 RESPOSTAS CONDICIONADAS ELETROFISIOLÓGICAS

6.2.1 ALTERAÇÕES DA COMPOSIÇÃO ESPECTRAL DO LFP

No grupo pareado, o condicionamento ao medo levou a uma redução da energia em todas as bandas de frequência durante a apresentação do EC no teste, mas não nos intervalos entre as apresentações do som. Além disso, essa redução não foi evidente no período basal, antes do início da apresentação do EC no teste. Nenhuma alteração na composição espectral dos LFPs foi observada no grupo não pareado.

Uma possibilidade seria que a apresentação do estímulo auditivo, levando a uma concentração da energia do LFP em torno de fm , levaria a uma diminuição da energia nas outras bandas de frequência. Entretanto, este não pode ser o caso, já que, no pré-treino, não houve alterações na composição espectral do sinal durante a apresentação do som. O efeito da redução generalizada de energia só ocorre no teste, sendo mais proeminente nos períodos de apresentação do som. Como já colocado na *Introdução*, já é bem estabelecido que as células do CI apresentam atividade oscilatória espontânea. É possível especular que estas oscilações espontâneas sejam o resultado de interações com neurônios provenientes de outras regiões do SNC e que podem alterar a responsividade do CI às aferências das vias auditivas ascendentes. É possível que este fenômeno represente uma alteração dinâmica no estado de processamento do CI durante a apresentação do EC após o condicionamento, no sentido de não envolver as células do CI em outros engramas que não sejam de processamento do estímulo auditivo relevante.

Como neste trabalho estamos lidando com registros de LFP em somente uma área, é necessário investigar o significado funcional destas alterações espectrais em nível de registros unitários, avaliando se oscilações em bandas de frequências específicas são capazes de alterar a temporização da atividade dos neurônios. Além disso, são necessários experimentos envolvendo registros simultâneos no CI e em

outras áreas que para ele projetam. Se as alterações identificadas nas bandas de energia do LFP estiverem refletindo alterações nas interações de neurônios de outras áreas do SNC com o CI, então análises de coerência de amplitude e de fase entre sinais dessas áreas (ver *Introdução*), em bandas de frequências específicas, revelarão também alterações na conectividade entre as áreas. Estes estudos são importantes, pois é possível que tenhamos uma situação em que a quantidade total de energia em algumas bandas de frequência esteja reduzida, mas talvez o acoplamento funcional entre grupos celulares específicos esteja aumentado, ou mesmo esteja aumentado o acoplamento entre os disparos unitários e alguma oscilação detectada no LFP.

Apesar de não haver estudos na literatura caracterizando as alterações da composição espectral de sinais no CI após condicionamento, estudos anteriores fizeram esta caracterização para outras áreas encefálicas (Iwata e Mikuni, 1980; Headley e Weinberger, 2013; Weinberger, Miasnikov *et al.*, 2013). Em contextos aversivos (gaiola de Skinner), acompanhado do comportamento de congelamento, a atividade na faixa de frequência entre 7,5 e 13,0 Hz aumentou significativamente no córtex e no hipocampo, mas não no complexo amigdalóide e no núcleo caudado (Iwata e Mikuni, 1980). O fato de estas alterações surgirem em áreas específicas é um forte indício de que as alterações espectrais não são um mero artefato devido à imobilidade dos animais, mas um fenômeno fisiológico associado ao aprendizado. O fato de este trabalho ter encontrado aumento de energia na banda de frequência avaliada pode se dever ao fato de terem analisado somente áreas associativas, que são sabidamente áreas envolvidas na geração de ritmos espontâneos. Como avaliamos uma área com função primariamente auditiva, é possível que a suspensão de ritmos espontâneos seja uma alteração fisiológica no sentido de incrementar o processamento de sons relevantes. Similarmente ao nosso trabalho (em que as alterações espectrais eram ausentes quando o animal era colocado no contexto A e só surgiam quando se iniciava a apresentação do EC) as alterações espectrais descritas naquele estudo desapareceram quando os animais retornaram às suas gaiolas e reapareciam imediatamente quando recolocados no contexto aversivo novamente.

6.2.2 GERADORES NEURAIIS DOS PEARP

Como colocado inicialmente na introdução, os LFPs refletem vários fenômenos celulares originados de população de neurônios próxima ao eletrodo de registro, podendo ter resolução espacial variável. No entanto, os controles histológicos e eletrofisiológicos sugerem fortemente que o sinal registrado de fato se originava no núcleo central do CI. Todos os animais usados para as comparações de grupo apresentaram eletrodo corretamente posicionado no CI. O alto aproveitamento da cirurgia, pode, em parte ser explicado pelo procedimento de varredura à procura de PEAt antes da fixação do capacete. Os componentes dos PEAt que obtivemos nos animais deste trabalho são bastante semelhantes, em sua amplitude e latência, aos obtidos em outros trabalhos da literatura. Ademais, o fato de os PEAt terem mantido seus componentes bastante estáveis ao longo do experimento é um indício consistente de que o grupo de neurônios registrados ao longo do experimento foi o mesmo para cada um dos animais. Os efeitos do condicionamento observados, portanto, não podem ser atribuídos a variações de posição do eletrodo durante o experimento, e sim a alterações funcionais destes grupos neuronais que foram registrados.

Apesar de alguns eletrodos terem sido posicionados muito próximos dos córtices externo e dorsal do CI, há razões para acreditar que o principal gerador dos LFPs registrados tenha sido o núcleo central. Além da sincronização temporal das flutuações dos potenciais de membrana dos agregados neuronais (Buzsaki, Anastassiou *et al.*, 2012), para que atividade de grupos celulares gerem LFPs significativos para os registros eletrofisiológicos, um fator importante a ser considerado é a geometria dos seus dendritos. No chamado arranjo geométrico em 'campo aberto', a fonte e o sorvedouro de corrente se encontram substancialmente separados, favorecendo a formação de dipolos mais robustos. Além disso, se os dendritos se dispõem paralelamente uns aos outros e de maneira compactada, cria-se uma arquitetura ideal para a superposição de dipolos ativos sincronicamente (Buzsaki, Anastassiou *et al.*, 2012). Este é precisamente o caso dos neurônios principais do núcleo central do CI, em contraposição aos neurônios dos córtices externos e dorsal (Faye-Lund e Osen, 1985).

Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a mostrar efeitos de modulação cognitiva nos PEARp registrados a partir de eletrodos profundos. Muito embora estudos recentes, já discutidos na introdução, tenham sugerido que os PEARp reflitam fenômenos neurais de interação entre osciladores endógenos e osciladores induzidos por estímulo, dois pontos importante devem ser levantados na interpretação destes resultados. Primeiramente, apesar de os registros de escalpo terem resolução espacial muito baixa, o córtex é considerado o principal gerador. No caso das PEARp, os principais geradores neurais da resposta são neurônios dos córtices auditivos, e a contribuição de estruturas profundas, como o CI, é considerada mínima. Adicionalmente, a baixa relação sinal/ruído dos registros de escalpo impõe importantes limitações à análise dos dados coletados e torna necessário o procedimento de realização de médias entre os eventos para a obtenção de uma resposta robusta. Neste trabalho, o uso de microelétrodos implantados profundamente para o registro dos PEARp em grupos locais de neurônios do CI foi um fator fundamental para a ótima relação sinal/ruído obtida. Consequentemente à alta qualidade das respostas em cada apresentação do EC, não foi necessária a realização de médias, propiciando a oportunidade de avaliarmos a evolução dinâmica dos componentes espectrais do PEARp ao longo das apresentações do EC e mesmo durante a apresentação do EC.

6.2.2 OS PEARP REFLETEM PROCESSOS NÃO LINEARES NO SNC

Apesar de, em um primeiro momento, considerar-se que as oscilações neurais que constituem os PEARp seriam o resultado da superposição de componentes de média latência dos PEAt (Galambos, Makeig *et al.*, 1981) (deflexões que ocorrem em torno de 10-50 ms (Jacobson e Grayson, 1988)), algumas evidências provenientes de registros de escalpo, já citadas na *Introdução* deste trabalho, levam ao questionamento desta interpretação. Um primeiro grupo de evidências se baseia na ideia de que o sistema auditivo integra temporalmente informações sucessivas para o reconhecimento de padrões e formação de percepto (Bregman, 1994; Bregman, 2005). Alguns trabalhos sugerem que o limiar para reconhecimento de padrões de estímulos auditivos se torna menor à medida que se aumenta a duração dos estímulos (Ross, Picton *et al.*, 2002). O limiar diminuído com

o aumento da duração indica que a integração do sinal auditivo ao longo do tempo depende da estabilidade do estímulo em uma escala temporal maior, próxima à escala dos eventos cognitivos, que está em torno de centenas de milissegundos (Varela, Lachaux *et al.*, 2001; Florentine, Fastl *et al.*, 1988). Esta estabilidade temporal da estimulação e da resposta neural é precisamente o que caracteriza os PEArp e os diferencia dos PEAt, e, portanto, coloca-os em situação de ferramenta ideal para o estudo de fenômenos neurais relacionados a modulação cognitiva. Nesse sentido, já foi demonstrado, por exemplo, em registros magnetoencefalográficos, que a amplitude dos PEArp aumenta gradativamente durante os primeiros 200 milissegundos após o início do estímulo e da mesma forma a fase, antes de atingir um valor estável, também apresenta este mesmo período inicial de transição. Neste mesmo trabalho também foi mostrado que a resposta oscilatória continua durante aproximadamente 50 milissegundos após o fim do estímulo auditivo. Estes resultados sugerem que os PEArp podem ser um correlato eletrofisiológico da integração temporal da informação auditiva para a formação de perceptos estáveis, e que este processo de integração ocorre em uma escala temporal de centenas de milissegundos (Ross, Picton *et al.*, 2002). Outro estudo do mesmo grupo mostrou que a atividade oscilatória dos PEArp pode ser desorganizada pela apresentação de um breve pulso de ruído de 5 ms, e essa desorganização se prolonga por 250 ms após o término do pulso. O efeito prolongado não pode ser explicado se assumimos que o PEArp seja o resultado da superposição de respostas transitórias. Este resultado, ao contrário, indica que uma mudança abrupta na cena auditiva interrompe a integração temporal da cena que estava em andamento no SNC e era refletida pelo PEArp (Ross, Herdman *et al.*, 2005).

Se a modulação cognitiva do processamento dos sons do ambiente depende do reconhecimento de padrões por parte do observador, e este reconhecimento é uma consequência do processo de integração temporal, fica perfeitamente justificado o fato de estudos anteriores com registros de escalpo não terem sido capazes de demonstrar nenhum efeito atencional nas respostas de tronco encefálico a cliques dentro dos primeiros 10 ms após o início do som (Hackley, Woldorff *et al.*, 1990). A modulação cognitiva no tronco encefálico deve, de fato, ocorrer após a primeiras ondas do PEAt, em decorrência da atividade coordenada de diversas

áreas que enviam projeções descendentes relacionadas ao contexto, ainda enquanto a informação auditiva está sendo transmitida pelo tronco. Corroborando esta ideia, existem dados de ressonância magnética funcional que mostraram que a atividade no CI aumenta diante da escuta atenta a blocos de som de 20 segundos (Rinne, Balk *et al.*, 2008). Estes resultados aparentemente contraditórios se tornam completamente explicáveis se considerarmos a modulação cognitiva no tronco encefálico na escala temporal adequada, na casa das centenas de milissegundos.

6.2.3 DESVIOS DE FASE

Um achado relevante deste trabalho é o fato de que no grupo pareado, o componente de fase tem um desvio significativo dos valores basais logo que os animais são re-expostos ao EC no teste, mas após mais algumas apresentações do EC, retornam aos seus valores iniciais do pré-treno.

Ainda é uma questão em aberto quais fenômenos neurais a fase dos PEArp reflete especificamente. De maneira geral, pode-se dizer que a fase reflete a temporização da atividade das populações neuronais registradas em relação ao estímulo acústico. No entanto, certamente este tempo não deve corresponder à latência de ativação do CI pelas vias auditivas ascendentes, como evidenciado nos PEAt. Se a temporização das respostas neurais em estado estável reflete a integração de aferências sensoriais e vias de retroalimentação, seria um simplismo esperar que exista uma correlação direta entre a fase dos PEArp e a latência dos componentes dos PEAt. Como foi discutido na seção anterior, a existência desta não-linearidade já foi provada no que concerne a geradores corticais das PEArp. A importância dos resultados apresentados neste trabalho consiste em terem iniciado essa discussão para uma estrutura de tronco encefálico, que se encontra muito próxima dos receptores sensoriais e que, de acordo com os paradigmas tradicionais, deveria prover uma codificação invariante dos sons do ambiente para os níveis hierárquicos mais altos do SNC. O fato de esta variação de temporização ocorrer no CI após o aprendizado significa que o SNC pode modificar a codificação de sons relevantes mesmo em estruturas caudais da via auditiva.

O desvio de fase observado só pode ser explicado pelo surgimento de outro oscilador (que pode se constituir de uma projeção de uma única área ou de um conjunto de projeções) na frequência de 53,71 Hz e que determina potenciais sinápticos nas células do CI nesta mesma frequência (ressalta-se mais uma vez que oscilações em outras bandas não têm efeito nesta frequência específica). Como estamos tratando de uma via ativada em estado estável, podemos considerar que todas as projeções envolvidas no processamento do estímulo acústico, ascendentes e de retroalimentação, estão ativadas quando avaliamos a atividade dos neurônios do CI, e a fase do sinal registrado, na frequência de 53,71 Hz, reflete a somação espacial (talvez sináptica) de todos esses osciladores nesta frequência.

Como este valor de frequência está dentro da banda de frequência gama do LFP, uma possibilidade levantada foi que os desvios de fase observados se devessem ao surgimento de um aumento de energia nesta banda de frequência após o condicionamento, o que é um fenômeno já descrito para o córtex auditivo (Headley e Weinberger, 2013). O aumento de energia na banda gama durante a apresentação de estímulos sensoriais ocorre em uma faixa de frequência extensa (40-120 Hz) e, portanto, poderia ter efeito no sinal registrado em *fm*. Alguns argumentos, no entanto, vão contra a hipótese de que a mudança de fase observada se deva ao surgimento de uma oscilação endógena na banda gama. Primeiramente, estas oscilações surgem nos registros durante períodos bastante restritos de tempo, em torno de 100 ms (Gray e Singer, 1989). No entanto, os desvios de fase observados no grupo pareado são fenômenos estáveis durante cerca de 20 segundos. Além disso, na caracterização espectral do sinal do CI, o efeito do condicionamento ao medo foi o de redução de energia na banda gama durante a apresentação do EC, ao contrário de resultados já descritos para outras áreas auditivas e outros sistemas sensoriais (Headley e Weinberger, 2013; Headley e Weinberger, 2011; Gray e Singer, 1989). Consideramos mais plausível, neste contexto, a hipótese de que a mudança de fase se deva ao aumento momentâneo da atuação projeções de retroalimentação diretamente no processamento do EC, que também oscilam em *fm*, e que, na situação de estimulação em regime permanente, se tornariam evidentes como a adição de um oscilador ao sinal registrado. O córtex auditivo, sendo uma das principais fontes de projeção para o CI e uma estrutura geradora de PEArp nesta faixa de frequência, é uma estrutura em

potencial para futuras investigações acerca dos mecanismos envolvidos nestes desvios de fase. O fato de os PEArp constituírem oscilações em um valor de frequência específico permite que estudos futuros com eletrodos implantados em mais de uma área avalie funções de coerência de fase e de amplitude em fm para avaliação de alterações dinâmicas de conectividade entre áreas envolvidas no processamento do tom AM.

O fato de os desvios de fase antecederem os aumentos de amplitude e de PLF levanta a possibilidade de que esta atuação momentânea de uma projeção, antes não ativa, nos neurônios do CI tenham um efeito causal na facilitação do circuito que processa o EC. Para explorar esta hipótese, deve-se verificar, primeiramente, se os neurônios que apresentam aumento de amplitude e PLF, são os mesmos que apresentaram desvios de fase anteriormente. Uma limitação importante do uso de potenciais de campo local, neste caso, é o fato de não podermos fazer este tipo de inferências, dado que os registros refletem atividade de populações de células. Dessa forma, experimentos futuros utilizando técnicas de registro multiunitários poderão ser úteis para responder esta questão. Outra possibilidade seria a de que o desvio de fase e a facilitação do circuito seriam eventos paralelos, e que no momento em que visualizamos os desvios de fase, as células já apresentariam resposta potenciada, porém mascarada pelos desvios de fase. Os resultados que apresentamos com relação à evolução temporal dos desvios de fase, no entanto, vão contra esta hipótese, já que no primeiro bloco de 10 segundos, não houve variação importante da fase, o que significa que se esta hipótese estivesse correta teríamos valores altos de amplitude. Entretanto, a amplitude foi igual para os 3 blocos de 10 segundos em que se avaliou o desvio de fase.

A escolha por analisar a fase dos PEArp como diferenças de fase em relação a um valor basal é justificada exatamente pelo fato de haver uma grande variabilidade no valor de fase entre os animais no pré-treino, quando a valência do estímulo acústico era ainda neutra para os animais. Esta neutralidade garante-se pelo fato de os animais apresentarem baixa porcentagem de comportamento de congelamento que os animais apresentaram durante estas apresentações do EC no primeiro dia de experimento. Entretanto, para o mesmo animal, geralmente o valor da fase foi bastante reprodutível para as cinco apresentações do EC no pré-treino,

com apenas duas exceções já citadas na seção *Resultados*, que surgem no momento em que os animais se encontravam extremamente adaptados ao EC. A variabilidade da fase contrasta, de maneira marcante, com a reprodutibilidade dos componentes dos PEAt que encontramos entre os animais, o que mais uma vez sugere que os geradores neurais dos dois tipos de resposta envolvam substratos diferentes. Pode-se supor, com estes resultados, que a população de neurônios que gera o LFP registrado pode participar de diferentes engramas, de modo que a fase dos PEArp podem ser altamente sensíveis a estados momentâneos da rede neural à qual estes neurônios se conectam.

Os nossos achados dão suporte à ideia de que a fase, como reflexo temporal da integração sináptica no CI, é uma variável dinâmica, podendo ser sensível a alterações plásticas nos circuitos envolvidos no condicionamento ao medo e que influenciam o processamento dos sons relevante no CI. Embora nosso estudo não tenha avançado em identificar mecanismos e estruturas que possivelmente sejam responsáveis por estes desvios de fase, algumas hipóteses podem ser levantadas. Alguns fatos sugerem que as mudanças de fase possam refletir uma participação maior da atividade de neurônios da amígdala nos engramas que envolvem os neurônios do CI, mesmo que não por uma projeção direta amígdala-colículo. Primeiramente, a dinâmica temporal das alterações plásticas na amígdala, em protocolos de condicionamento ao medo semelhantes aos deste trabalho, é bastante parecida à dinâmica dos desvios de fase que observamos: desvios da linha base nas primeiras apresentações do EC seguidos de retorno gradual aos valores basais (Quirk, Armony *et al.*, 1997). Adicionalmente, já foi mostrado que a integridade da atividade da amígdala é necessária para o desenvolvimento de alterações plásticas em outras estruturas auditivas após o condicionamento ao medo (Maren, Yap *et al.*, 2001). Não existem trabalhos, até o momento, que investigassem a existência de uma projeção direta da amígdala para o colículo em ratos, apesar de que em morcegos (Marsh, Fuzessery *et al.*, 2002) esta conexão já seja bem estabelecida (sendo provavelmente glutamatérgica (Mcdonald, 1996)) e de que, em gatos, a amígdala envie extensas projeções para o mesencéfalo (Hopkins e Holstege, 1978). É possível que a via direta exista também em ratos, o que ainda é passível de investigação, mas também é completamente plausível que a amígdala influencie o

processamento dos sons relevantes no CI influenciando indiretamente outras áreas que, por sua vez, sabidamente projetam-se para o CI.

Poucos estudos na literatura avaliaram o efeito de variáveis cognitivas na fase dos PEARp. Um estudo em humanos avaliou os componentes de fase e amplitude dos PEARp em uma tarefa na qual o grupo experimental era treinado a identificar uma sutil variação de amplitude durante a apresentação de um tom AM. No primeiro experimento, foi evidente um avanço de fase (em torno de $6,6^\circ$) na segunda de duas sessões de treinamento separadas por 24-72 horas, que, no entanto, ocorreu tanto no grupo explicitamente treinado como no grupo que foi exposto passivamente ao som. Ao invés de duas sessões, o segundo experimento deste trabalho consistiu de uma sessão diária, durante dez dias, nas quais se evidenciou um avanço progressivo da fase (atingindo um desvio máximo de $14,7^\circ$ no último dia) ao longo das sessões. O desvio de fase se correlacionou consistentemente com o desempenho na tarefa, ao contrário do aumento de amplitude. Comparando os resultados deste, com os do nosso trabalho, fica claro o fato de os desvios de fase que encontramos serem bem maiores, atingindo uma média de $-76,9^\circ$ após o aprendizado associativo. Isto pode explicar-se por algumas diferenças entre os dois trabalhos. Como a obtenção dos PEARp no estudo citado se baseou na realização de médias de aproximadamente 200 eventos, não houve resolução temporal entre os eventos. É possível que, por uma limitação relacionada a esta resolução, desvios maiores que possam ter ocorrido às primeiras apresentações do som tenham se diluído com a realização de médias. Outra diferença importante é que os dois trabalhos tratam de geradores neurais diferentes. É plausível supor que os PEARp de córtex apresentem variações de fase com amplitudes diferentes das variações de fase do CI. Com relação à dinâmica temporal dos desvios de fase, são necessários mais experimentos para esclarecer se a progressão dos valores com os dias de treinamento, que se observou no córtex, ocorreria também no CI; também seria importante esclarecer, por meio de experimentos com melhor resolução temporal, se o padrão bimodal de desvio e retorno à linha de base, observado no CI, ocorreria também no córtex. Por fim, é preciso ressaltar que, no estudo citado, a tarefa proposta aos participantes se aproxima de um condicionamento operante, ao passo que, no nosso caso, o protocolo de treinamento consistiu de um condicionamento clássico. Estes dois protocolos sabidamente envolvem substratos neurais diferentes,

e, no caso do nosso protocolo, o estímulo auditivo adquiria relevância biológica exacerbada para os animais. Outra diferença importante que deve ser mencionada, é que o estudo citado não encontrou aumento de amplitude no primeiro experimento. Este aumento ocorreu somente décimo dia do segundo experimento, de forma que não se correlacionou com a curva de aprendizado, ao contrário da fase. Neste mesmo trabalho, (e em outros estudos anteriores abordando o efeito de atenção seletiva sobre os PEArp) o efeito atencional não se mostrou significativo em alterar o componente de fase, apesar de ser eficaz em levar a aumentos de amplitude. Estes resultados são sugestivos de que aumento de amplitude e desvios de fase podem se dever a duas classes distintas de fenômenos neurais, que em última análise também refletem duas classes de modulação cognitiva, uma relacionada ao aprendizado de reconhecimento de um padrão, e outra relacionada ao aumento da resposta neural do estímulo relevante.

6.2.4 AUMENTO DA RESPOSTA NEURAL AOS SONS RELEVANTES

De acordo com a hipótese do portão sensorial, a modulação cognitiva em níveis iniciais dos sistemas sensoriais seria um importante mecanismo para filtrarem-se sons irrelevantes e aumentar-se a resposta a sons relevantes. Isto significa que, após o reconhecimento da relevância dos estímulos pelos circuitos neurais, um possível efeito de tal modulação seria que a resposta neural nestes níveis iniciais poderia ser mais diretamente predita como função de eventos externos. No nosso trabalho, este efeito de aumento da resposta se reflete em duas variáveis eletrofisiológicas: o PLF e a amplitude, que tiveram aumentos concomitantes. Ambos os aumentos ocorreram imediatamente após os valores absolutos de fase retornarem aos seus níveis basais, a partir da quarta apresentação do EC no teste.

Na literatura, os únicos artigos que quantificaram a consistência de fase em períodos sucessivos de um dado componente de frequência da transformada de Fourier de um sinal deram o nome a esta variável de índice de agrupamento de fase (PCI) (Kalitzin, Parra *et al.*, 2002; Parra, Kalitzin *et al.*, 2003). Nestes trabalhos, o PCI obtido de registros de escalpo pacientes com epilepsia fotossensível, em situações de estimulação fótica periódica, foi um eficaz preditor da ocorrência de

crises epilépticas, já que seus valores aumentavam significativamente antes das crises. No presente trabalho, quantificamos também a consistência de fase, porém usando um índice diferente destes outros trabalhos, o fator de agrupamento de fase (PLF), que tradicionalmente tem sido usado como uma medida de estabilidade de fase entre apresentações de estímulos (Lachaux, Rodriguez *et al.*, 1999; Oda, Onitsuka *et al.*, 2012). A diferença na obtenção dos dois índices é que no caso do PLF, as amplitudes dos números complexos são primeiramente transformadas em valores unitários e em seguida é calculado o vetor resultante. No caso do PCI, primeiro calcula-se o vetor resultante e em seguida realiza-se a normalização do número complexo para a amplitude unitária. O PLF pode ser uma estimativa bastante instável no caso da presença de componentes de baixa magnitude, podendo subestimar o vetor resultante. O PCI, por sua vez, em situações de boa relação sinal ruído pode superestimar o valor do vetor resultante (Kalitzin, Parra *et al.*, 2002). Como estávamos lidando com uma situação de boa relação sinal-ruído, assumimos que os componentes de baixa magnitude não trariam problemas para a análise final.

Quando consideramos os processos neurofisiológicos envolvidos no aumento do PLF, podemos assumir que, uma vez que os potenciais de campo correspondem à atividade de populações de neurônios, maiores agrupamento de fase refletem menores variâncias das fases de neurônios individuais. No caso de o LFP ser determinado por um estímulo periódico, como o tom AM que usamos neste trabalho, pode-se considerar que o PLF é uma medida da sincronização dos neurônios responsivos ao som a uma fase específica de f_m . Dessa forma, o aumento do PLF observado na quarta e na quinta apresentação do EC sugere que a atividade neural do CI está sendo mais eficientemente determinada pelas aferências sensoriais neste momento do teste.

A amplitude dos PEArp aumentou na quinta apresentação do som. Este aumento pode inicialmente significar que os neurônios passaram a apresentar despolarizações sinápticas mais intensas, o que coincide com a taxa de disparo aumentada encontrada em alguns trabalhos. A maior amplitude pode também ser um correlato de maior número de neurônios que passaram a apresentar despolarizações sinápticas, o que também é um mecanismo possível já que o condicionamento ao medo leva a mudanças nas curvas de sintonia dos neurônios do

CI, de modo que mais neurônios passam a ter resposta ótima em torno da frequência do EC. Um terceiro mecanismo que poderia levar ao aumento da amplitude seria o aumento da sincronia temporal da atividade dos neurônios. Se os neurônios disparam ao mesmo tempo atividade elétrica registrada pelo eletrodo é maior do que se sua atividade estiver dispersa temporalmente. A partir de registros de LFP é impossível diferenciar entre os três mecanismos, embora seja razoável imaginar que os três fenômenos possam ocorrer no CI e resultar na amplificação do PEArp. Independentemente do mecanismo, pode-se dizer que esta amplificação reflete uma facilitação do circuito que conduz a informação auditiva para ao sistema tálamo-cortical que é dependente de vários outros sistemas envolvidos no condicionamento ao medo.

A integridade do funcionamento dos circuitos da amígdala possivelmente tem papel fundamental na amplificação das respostas evocadas auditivas no CI. Trabalhos de manipulação farmacológica mostraram que o bloqueio de BLA com injeção de um agonista GABAérgico leva ao aumento dos PEAt no CI de ratos com perfil de alta ansiedade no labirinto em cruz, mas não em ratos com perfil normal (Nobre e Brandao, 2011). Estes resultados sugerem que a integridade da função de BLA leva a um controle inibitório tônico nos neurônios do CI destes animais (ressalta-se mais uma vez que este efeito não necessariamente depende de uma projeção direta). Extrapolando esta hipótese aos nossos resultados, se, como sugerimos anteriormente, o desvio de fase inicial que observamos refletir uma maior participação de circuitos da amígdala no processamento do som, o retorno da fase aos valores basais, significaria, da mesma forma, uma menor participação destes circuitos, e também a remoção da inibição tônica. Esta sequência explica perfeitamente os resultados que reportamos, já que o aumento da amplitude das respostas evocadas ocorre somente após a fase retornar aos valores basais.

O funcionamento do sistema colinérgico é essencial no desenvolvimento de plasticidade no sistema auditivo. No caso do córtex auditivo, sabe-se que as alterações plásticas decorrentes do condicionamento ao medo dependem do aumento da concentração de acetilcolina nas proximidades dos seus neurônios, que é conseqüente à ativação do sistema colinérgico do prosencéfalo basal pela amígdala. Os neurônios do córtex auditivo, por sua vez, enviam projeções para o sistema colinérgico mesencefálico. Estes neurônios colinérgicos fazem sinapse com

o CI (Motts e Schofield, 2011; 2009) e aparentemente têm importância fundamental no ajuste da sua responsividade aos EC, já que a injeção de antagonista colinérgico no CI inibe o aparecimento alterações plásticas nesta estrutura após o condicionamento ao medo (Ji e Suga, 2009). Esta sequência de eventos justifica o aumento de amplitude relativamente tardio dos PEArp no CI encontrados no nosso estudo, que coincide com resultados anteriores de outros trabalhos da literatura. Estes trabalhos mostraram que, após o condicionamento ao medo auditivo, o aparecimento plasticidade nas respostas evocadas em áreas auditivas é posterior à plasticidade em áreas associativas e também ao aparecimento das respostas comportamentais. Sabe-se, por exemplo, que as alterações plásticas no núcleo talâmico posterior (Disterhoft e Stuart, 1976), no hipocampo (Kraus e Disterhoft, 1982), e na amígdala lateral (Quirk, Armony *et al.*, 1997) precedem a plasticidade do córtex auditivo. Quando se consideram somente estruturas na via auditiva, as alterações plásticas relacionadas ao condicionamento ao medo também ocorrem sequencialmente: primeiramente são evidentes nos córtices auditivos seguidos do corpo geniculado medial, e só posteriormente são evidentes no CI e no núcleo coclear (Disterhoft e Stuart, 1976; Oleson, Ashe *et al.*, 1975; Edeline, Neuenschwander-EI Massioui *et al.*, 1990).

O papel do córtex auditivo é determinante na codificação de estímulos no CI e pode ter tido importância fundamental nas alterações plásticas que encontramos. A manipulação de neurônios corticais, de várias maneiras, altera a sensibilidade do CI a vários parâmetros do som, como frequência (Ma e Suga, 2001; Yan, Zhang *et al.*, 2005), intensidade (Yan e Ehret, 2002), duração (Varela, Lachaux *et al.*, 2001) e localização (Nakamoto, Jones *et al.*, 2008; Zhou e Jen, 2005). O condicionamento ao medo auditivo induz mudanças nas curvas de sintonia dos neurônios de CI, que se deslocam em direção à frequência do EC (Ji e Suga, 2009; Gao e Suga, 1998), aumentando o número de células que se dedicam à codificação do estímulo relevante. Por sua vez, a estimulação elétrica de uma região cortical que representa uma frequência específica também causa deslocamentos na curva de sintonia dos neurônios de CI em direção a estas frequências, de modo semelhante ao que ocorre no condicionamento ao medo (Ma e Suga, 2001; Yan e Ehret, 2002; Yan e Suga, 1998), sugerindo que os neurônios corticais tenham importância fundamental na amplificação dos estímulos relevantes no CI. De fato, a inativação do córtex auditivo

inibe o desenvolvimento das mudanças de curvas de sintonia nos neurônios do CI após o condicionamento ao medo auditivo (Ji e Suga, 2009; Gao e Suga, 1998). Apesar de o córtex auditivo poder determinar as alterações plásticas no CI indiretamente por meio de suas projeções para o sistema colinérgico mesencefálico citado anteriormente, é válido lembrar que as conexões diretas córtico-coliculares são extremamente numerosas e também devem ter efeito na responsividade do CI. Um único estudo na literatura conseguiu demonstrar que a fotólise dos corpos celulares destes neurônios córtico-coliculares prejudica o desenvolvimento de plasticidade nos CI (Bajo, Nodal *et al.*, 2010), apesar de ser possível que os estes mesmos neurônios projetem também para o sistema colinérgico mesencefálico.

6.2.5 OUTROS ESTUDOS QUE AVALIARAM PLASTICIDADE NO COLÍCULO INFERIOR APÓS O CONDICIONAMENTO AO MEDO.

O presente trabalho não foi o primeiro a abordar a questão da plasticidade neural no CI após o condicionamento clássico auditivo. Puderam-se encontrar sete trabalhos na literatura que abordaram este tema, no entanto, com resultados contraditórios. Todos os trabalhos que não encontraram alterações plásticas se basearam em protocolos de condicionamento clássico apetitivo (Birt, Nienhuis *et al.*, 1979; Birt e Olds, 1981; Olds, Disterhoft *et al.*, 1972), muito embora um dos trabalhos usando este tipo de protocolo tenha demonstrado alterações plásticas consistentes no CI (Disterhoft e Stuart, 1976). Como o aprendizado neste tipo de condicionamento depende de plasticidade em uma circuitaria neural diferente daquela necessária para o aprendizado no condicionamento ao medo, a comparação de estudos usando estes dois protocolos deve ser feita com reservas.

Até onde sabemos apenas três trabalhos foram elaborados especificamente para avaliar os efeitos do condicionamento ao medo auditivo na responsividade do CI. Apesar de terem encontrado alterações plásticas consistentes, críticas importantes a estes estudos já foram levantadas anteriormente na discussão dos resultados comportamentais, e se referem ao fato de as alterações encontradas serem inespecíficas. Um dos estudos encontrou alterações plásticas significativas no grupo não pareado (Ji e Suga, 2009), enquanto outro encontrou alterações na resposta ao som quando os animais foram condicionados com estímulos fóticos

(Mark e Hall, 1967). O terceiro estudo também encontrou alterações plásticas no CI, mas seu desenho experimental não contou com nenhum grupo controle (Gao e Suga, 1998). Não obstante, nos resultados que apresentamos no presente estudo, uma característica fundamental das respostas condicionadas eletrofisiológicas é que elas são evidentes somente no grupo pareado. Existem algumas particularidades do desenho experimental destes trabalhos que os diferenciam de maneira importante do nosso estudo, e podem explicar a discrepância no que concerne às alterações plásticas inespecíficas. Primeiramente, todos eles se basearam na utilização de estímulos transientes para a obtenção das respostas evocadas. Como já discutido anteriormente, estes estímulos são salientes em relação à cena auditiva em que o animal se encontra, e por este motivo já apresentam um processamento neural diferenciado. No caso do nosso trabalho, usaram-se tons AM como EC. Este tipo de estimulação aparentemente foi eficaz em criar um ambiente acústico estável, no qual o estímulo experimental não se destacou perceptualmente em relação aos sons do ambiente. Ademais, com apenas uma exceção (Mark e Hall, 1967), os estudos anteriores avaliaram apenas o efeito das memórias de curto prazo, já que os testes foram realizados no mesmo dia do treino e no mesmo contexto do condicionamento ao medo. Nestes casos é possível assumir que a resposta aumentada aos estímulos no CI tenha se devido ao recrudescimento de estados de alerta inespecíficos relacionados a um contexto aversivo geral, e não à reorganização de circuitos relacionados ao aprendizado associativo. Como já discutido anteriormente na seção referente às respostas comportamentais, no nosso protocolo este efeito de contexto muito possivelmente foi minimizado pelos cuidados tomados na elaboração do experimento de condicionamento. Outra diferença importante é que no nosso trabalho, as alterações eletrofisiológicas observadas no CI são resultado de memórias de longo prazo referentes ao EC, já que se evidenciaram na re-exposição do animal ao estímulo 24 horas após o treino. Este é um achado bastante relevante, pois os trabalhos recentes concluíram que as alterações plásticas no CI têm duração de poucas horas e as alterações de longo prazo na codificação dos estímulos acústicos relevantes só se encontrariam em regiões corticais.

7 REFERÊNCIAS

- 1 PUEL, J. L. Chemical synaptic transmission in the cochlea. **Prog Neurobiol**, v. 47, n. 6, p. 449-76, 1995.
- 2 MALMIERCA, M. S. The structure and physiology of the rat auditory system: an overview. **Int Rev Neurobiol**, v. 56, p. 147-211, 2003.
- 3 BEYERL, B. D. Afferent projections to the central nucleus of the inferior colliculus in the rat. **Brain Res**, v. 145, n. 2, p. 209-23, 1978.
- 4 COLEMAN, J. R.; CLERICI, W. J. Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat. **J Comp Neurol**, v. 262, n. 2, p. 215-26, 1987.
- 5 KUDO, M.; NIIMI, K. Ascending projections of the inferior colliculus in the cat: an autoradiographic study. **J Comp Neurol**, v. 191, n. 4, p. 545-56, 1980.
- 6 CALFORD, M. B.; AITKIN, L. M. Ascending projections to the medial geniculate body of the cat: evidence for multiple, parallel auditory pathways through thalamus. **J Neurosci**, v. 3, n. 11, p. 2365-80, 1983.
- 7 KIMURA, A. et al. Auditory thalamic nuclei projections to the temporal cortex in the rat. **Neuroscience**, v. 117, n. 4, p. 1003-1016, 2003.
- 8 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, 2001.
- 9 NAATANEN, R.; WINKLER, I. The concept of auditory stimulus representation in cognitive neuroscience. **Psychol Bull**, v. 125, n. 6, p. 826-59, 1999.
- 10 VARELA, F.; THOMPSON, E.; ROSCH, E. **The Embodied Mind: Cognitive Science and Human Experience**. The MIT Press, 1992.
- 11 PAVLOV, I. P. **Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex**. Oxford, England: Oxford Univ. Press, 1927. xv, 430

- ¹² CHERRY, E. C. Some Experiments on the Recognition of Speech, with One and with Two Ears. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 25, n. 5, p. 975-979, 1953.
- ¹³ WARREN, R.; SHERMAN, G. Phonemic restorations based on subsequent context. **Perception & Psychophysics**, v. 16, n. 1, p. 150-156, 1974/01/01 1974.
- ¹⁴ WARREN, R. M. Perceptual restoration of obliterated sounds. **Psychological Bulletin**, v. 96, n. 2, p. 371-383, 1984.
- ¹⁵ BUZSAKI, G. **Rhythms of the Brain**. Oxford University Press, USA, 2006.
- ¹⁶ VARELA, F. et al. The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 229-239, 2001.
- ¹⁷ OESTREICHER, E.; WOLFGANG, A.; FELIX, D. Neurotransmission of the cochlear inner hair cell synapse--implications for inner ear therapy. **Adv Otorhinolaryngol**, v. 59, p. 131-9, 2002.
- ¹⁸ DOLEVICZENYI, Z. et al. Cochlear dopamine release is modulated by group II metabotropic glutamate receptors via GABAergic neurotransmission. **Neurosci Lett**, v. 385, n. 2, p. 93-8, 2005.
- ¹⁹ GRUTERS, K. G.; GROH, J. M. Sounds and beyond: multisensory and other non-auditory signals in the inferior colliculus. **Front Neural Circuits**, v. 6, n. 96, p. 00096, 2012.
- ²⁰ IWATA, N.; MIKUNI, N. EEG change in the conscious rat during immobility induced by psychological stress. **Psychopharmacology**, v. 71, n. 2, p. 117-22, 1980.
- ²¹ HEADLEY, D. B.; WEINBERGER, N. M. Fear conditioning enhances gamma oscillations and their entrainment of neurons representing the conditioned stimulus. **J Neurosci**, v. 33, n. 13, p. 5705-17, 2013.
- ²² LOPES DA SILVA, F. H. Event-related neural activities: what about phase? **Prog Brain Res**, v. 159, p. 3-17, 2006.
- ²³ KALITZIN, S. et al. Enhancement of phase clustering in the EEG/MEG gamma frequency band anticipates transitions to paroxysmal epileptiform

- activity in epileptic patients with known visual sensitivity. **IEEE Trans Biomed Eng**, v. 49, n. 11, p. 1279-86, 2002.
- 24 PARRA, J. et al. Gamma-band phase clustering and photosensitivity: is there an underlying mechanism common to photosensitive epilepsy and visual perception? **Brain**, v. 126, n. Pt 5, p. 1164-72, 2003.
- 25 LACHAUX, J. P. et al. Measuring phase synchrony in brain signals. **Hum Brain Mapp**, v. 8, n. 4, p. 194-208, 1999.
- 26 TORTEROLO, P.; PEDEMONTE, M.; VELLUTI, R. A. Intracellular in vivo recording of inferior colliculus auditory neurons from awake guinea-pigs. **Arch Ital Biol**, v. 134, n. 1, p. 57-64, 1995.
- 27 RYAN, A.; MILLER, J. Single unit responses in the inferior colliculus of the awake and performing rhesus monkey. **Experimental Brain Research**, v. 32, n. 3, p. 389-407, 1978.
- 28 PEDEMONTE, M.; TORTEROLO, P.; VELLUTI, R. A. In vivo intracellular characteristics of inferior colliculus neurons in guinea pigs. **Brain Res**, v. 759, n. 1, p. 24-31, 1997.
- 29 DIAMOND, I. T.; JONES, E. G.; POWELL, T. P. S. The projection of the auditory cortex upon the diencephalon and brain stem in the cat. **Brain Research**, v. 15, n. 2, p. 305-340, 1969.
- 30 FITZPATRICK, K. A.; IMIG, T. J. Projections of auditory cortex upon the thalamus and midbrain in the owl monkey. **J Comp Neurol**, v. 177, n. 4, p. 573-55, 1978.
- 31 WINER, J. A. et al. Descending projections to the inferior colliculus from the posterior thalamus and the auditory cortex in rat, cat, and monkey. **Hearing research**, v. 168, n. 1-2, p. 181-195, 2002.
- 32 ADAMS, J. Crossed and descending projections to the inferior colliculus. **Neuroscience letters**, v. 19, n. 1, p. 1-5, 1980.
- 33 BAJO, V. M.; KING, A. J. Cortical modulation of auditory processing in the midbrain. **Front Neural Circuits**, v. 6, n. 114, p. 3, 2012.

- 34 BAJO, V. M.; MOORE, D. R. Descending projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the gerbil, *Meriones unguiculatus*. **J Comp Neurol**, v. 486, n. 2, p. 101-16, 2005.
- 35 KUWABARA, N.; ZOOK, J. M. Geniculo-collicular descending projections in the gerbil. **Brain Res**, v. 878, n. 1-2, p. 79-87, 2000.
- 36 SENATOROV, V. V.; HU, B. Extracortical descending projections to the rat inferior colliculus. **Neuroscience**, v. 115, n. 1, p. 243-50, 2002.
- 37 ITAYA, S. K.; VAN HOESEN, G. W. Retinal innervation of the inferior colliculus in rat and monkey. **Brain Research**, v. 233, n. 1, p. 45-52, 1982.
- 38 YAMAUCHI, K.; YAMADORI, T. Retinal projection to the inferior colliculus in the rat. **Acta Anat**, v. 114, n. 4, p. 355-60, 1982.
- 39 COOPER, M. H.; YOUNG, P. A. Cortical projections to the inferior colliculus of the cat. **Exp Neurol**, v. 51, n. 2, p. 488-502, 1976.
- 40 DOUBELL, T. P. et al. Topographical projection from the superior colliculus to the nucleus of the brachium of the inferior colliculus in the ferret: convergence of visual and auditory information. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 12, p. 4290-308, 2000.
- 41 COOPER, M.; YOUNG, P. Cortical projections to the inferior colliculus of the cat. **Experimental neurology**, v. 51, n. 2, p. 488-502, 1976.
- 42 LARUE, D.; PRIETO, J.; WINER, J. The central gray and the inferior colliculus: an auditory-limbic interface. v. 288, 2005.
- 43 MARSH, R. A. et al. Projection to the inferior colliculus from the basal nucleus of the amygdala. **J Neurosci**, v. 22, n. 23, p. 10449-60, 2002.
- 44 HOPKINS, D. A.; HOLSTEGE, G. Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. **Experimental Brain Research**, v. 32, n. 4, p. 529-547, 1978/08/01 1978.
- 45 HURLEY, L. M.; POLLAK, G. D. Serotonin Effects on Frequency Tuning of Inferior Colliculus Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 85, n. 2, p. 828-842, February 1, 2001 2001.

- 46 _____ . Serotonin Shifts First-Spike Latencies of Inferior Colliculus Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 34, p. 7876-7886, August 24, 2005 2005.
- 47 HURLEY, L. M.; POLLAK, G. D. Serotonin modulates responses to species-specific vocalizations in the inferior colliculus. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 191, n. 6, p. 535-46, 2005.
- 48 HERBERT, H.; KLEPPER, A.; OSTWALD, J. Afferent and efferent connections of the ventrolateral tegmental area in the rat. **Anat Embryol**, v. 196, n. 3, p. 235-59, 1997.
- 49 LEVITT, P.; MOORE, R. Y. Origin and organization of brainstem catecholamine innervation in the rat. **J Comp Neurol**, v. 186, n. 4, p. 505-28, 1979.
- 50 KLEPPER, A.; HERBERT, H. Distribution and origin of noradrenergic and serotonergic fibers in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat. **Brain Res**, v. 557, n. 1-2, p. 190-201, 1991.
- 51 MOTTS, S. D.; SCHOFIELD, B. R. Cholinergic cells in the tegmentum send branching projections to the inferior colliculus and the medial geniculate body. **Neuroscience**, v. 179, p. 120-30, 2011.
- 52 _____ . Sources of cholinergic input to the inferior colliculus. **Neuroscience**, v. 160, n. 1, p. 103-14, 2009.
- 53 LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 155-84, 2000.
- 54 BROWN, J. S.; KALISH, H. I.; FARBER, I. E. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. **J Exp Psychol**, v. 41, n. 5, p. 317-28, 1951.
- 55 BOLLES, R. C.; FANSELOW, M. S. A perceptual–defensive–recuperative model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 3, n. 2, p. 291-323, 1980.
- 56 GROSSEN, N. E.; KELLEY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **J Comp Physiol Psychol**, v. 81, n. 2, p. 307-10, 1972.

- 57 CURTI, M. W. A further report on fear responses of white rats in the presence of cats. **Journal of Comparative Psychology**, v. 34, n. 1, p. 51-53, 1942.
- 58 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, 1979.
- 59 FANSELOW, M. S. Shock-induced analgesia on the formalin test: effects of shock severity, naloxone, hypophysectomy, and associative variables. **Behav Neurosci**, v. 98, n. 1, p. 79-95, 1984.
- 60 LEDOUX, J.; FARB, C.; RUGGIERO, D. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. **The Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 1043-1054, April 1, 1990.
- 61 ROMANSKI, L. M.; LEDOUX, J. E. Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. **Cereb Cortex**, v. 3, n. 6, p. 515-32, 1993.
- 62 MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Prog Neurobiol**, v. 55, n. 3, p. 257-332, 1998.
- 63 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, 1990.
- 64 ROMANSKI, L. M.; LEDOUX, J. E. Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. **J Neurosci**, v. 12, n. 11, p. 4501-9, 1992.
- 65 QUIRK, G. J.; ARMONY, J. L.; LEDOUX, J. E. Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. **Neuron**, v. 19, n. 3, p. 613-24, 1997.
- 66 QUIRK, G. J.; REPA, J. C.; LEDOUX, J. E. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: Parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, v. 15, n. 5, p. 1029-1039, 1995.
- 67 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, 1988.

- 68 EDELINE, J. M.; WEINBERGER, N. M. Thalamic short-term plasticity in the auditory system: associative returning of receptive fields in the ventral medial geniculate body. **Behav Neurosci**, v. 105, n. 5, p. 618-39, 1991a.
- 69 _____. Subcortical adaptive filtering in the auditory system: associative receptive field plasticity in the dorsal medial geniculate body. **Behav Neurosci**, v. 105, n. 1, p. 154-75, 1991b.
- 70 _____. Associative retuning in the thalamic source of input to the amygdala and auditory cortex: receptive field plasticity in the medial division of the medial geniculate body. **Behav Neurosci**, v. 106, n. 1, p. 81-105, 1992.
- 71 WEPSIC, J. G. Multimodal sensory activation of cells in the magnocellular medial geniculate nucleus. **Exp Neurol**, v. 15, n. 3, p. 299-318, 1966.
- 72 LUND, R. D.; WEBSTER, K. E. Thalamic afferents from the dorsal column nuclei. An experimental anatomical study in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 130, n. 4, p. 301-311, 1967.
- 73 MAREN, S.; YAP, S. A.; GOOSENS, K. A. The amygdala is essential for the development of neuronal plasticity in the medial geniculate nucleus during auditory fear conditioning in rats. **J Neurosci**, v. 21, n. 6, 2001.
- 74 GALVAN, V. V.; CHEN, J.; WEINBERGER, N. M. Long-term frequency tuning of local field potentials in the auditory cortex of the waking guinea pig. **J Assoc Res Otolaryngol**, v. 2, n. 3, p. 199-215, 2001.
- 75 GALVÁN, V. V.; WEINBERGER, N. M. Long-Term Consolidation and Retention of Learning-Induced Tuning Plasticity in the Auditory Cortex of the Guinea Pig. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 77, n. 1, p. 78-108, 2002.
- 76 WEINBERGER, N. M.; JAVID, R.; LEPAN, B. Long-term retention of learning-induced receptive-field plasticity in the auditory cortex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 6, p. 2394-8, 1993.
- 77 JI, W.; SUGA, N. Tone-specific and nonspecific plasticity of inferior colliculus elicited by pseudo-conditioning: role of acetylcholine and auditory and somatosensory cortices. **J Neurophysiol**, v. 102, n. 2, p. 941-52, 2009.
- 78 MANUNTA, Y.; EDELINE, J. M. Effects of noradrenaline on frequency tuning of auditory cortex neurons during wakefulness and slow-wave sleep. **Eur J Neurosci**, v. 11, n. 6, p. 2134-50, 1999.

- 79 _____ . Effects of noradrenaline on frequency tuning of rat auditory cortex neurons. **Eur J Neurosci**, v. 9, n. 4, p. 833-47, 1997.
- 80 STARK, H.; SCHEICH, H. Dopaminergic and serotonergic neurotransmission systems are differentially involved in auditory cortex learning: a long-term microdialysis study of metabolites. **J Neurochem**, v. 68, n. 2, p. 691-7, 1997.
- 81 JUCKEL, G. et al. Auditory evoked potentials reflect serotonergic neuronal activity--a study in behaving cats administered drugs acting on 5-HT1A autoreceptors in the dorsal raphe nucleus. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 6, p. 710-6, 1999.
- 82 BAO, S.; CHAN, V. T.; MERZENICH, M. M. Cortical remodelling induced by activity of ventral tegmental dopamine neurons. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 79-83, 2001.
- 83 HEADLEY, D. B.; WEINBERGER, N. M. Gamma-Band Activation Predicts Both Associative Memory and Cortical Plasticity. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 36, p. 12748-12758, September 7, 2011 2011.
- 84 POPESCU, A. T.; POPA, D.; PARE, D. Coherent gamma oscillations couple the amygdala and striatum during learning. **Nat Neurosci**, v. 12, n. 6, p. 801-7, 2009.
- 85 BAUER, E. P.; PAZ, R.; PARÉ, D. Gamma Oscillations Coordinate Amygdalo-Rhinal Interactions during Learning. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 35, p. 9369-9379, August 29, 2007 2007.
- 86 LOGOTHETIS, N. K. The underpinnings of the BOLD functional magnetic resonance imaging signal. **J Neurosci**, v. 23, n. 10, p. 3963-71, 2003.
- 87 MITZDORF, U. Properties of the evoked potential generators: current source-density analysis of visually evoked potentials in the cat cortex. **Int J Neurosci**, v. 33, n. 1-2, p. 33-59, 1987.
- 88 BUZSÁKI, G.; SILVA, F. L. D. High frequency oscillations in the intact brain. **Progress in Neurobiology**, v. 98, n. 3, p. 241-249, 2012.
- 89 MITZDORF, U. Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. **Physiol Rev**, v. 65, n. 1, p. 37-100, 1985.

- 90 GUSTAFSSON, B. Afterpotentials and transduction properties in different types of central neurones. **Arch Ital Biol**, v. 122, n. 1, p. 17-30, 1984.
- 91 KAMONDI, A. et al. Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: activity-dependent phase-precession of action potentials. **Hippocampus**, v. 8, n. 3, p. 244-61, 1998.
- 92 DAWSON, G. D. A summation technique for the detection of small evoked potentials. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**, v. 6, n. 1, p. 65-84, 1954.
- 93 _____. CEREBRAL RESPONSES TO ELECTRICAL STIMULATION OF PERIPHERAL NERVE IN MAN. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 10, n. 3, p. 134-140, August 1, 1947 1947.
- 94 MEEREN, H. K. et al. Auditory evoked potentials from auditory cortex, medial geniculate nucleus, and inferior colliculus during sleep-wake states and spike-wave discharges in the WAG/Rij rat. **Brain Res**, v. 898, n. 2, p. 321-31, 2001.
- 95 MAKEIG, S. et al. Mining event-related brain dynamics. **Trends Cogn Sci**, v. 8, n. 5, p. 204-10, 2004.
- 96 YANTIS, S.; JONIDES, J. Abrupt visual onsets and selective attention: voluntary versus automatic allocation. **J Exp Psychol Hum Percept Perform**, v. 16, n. 1, p. 121-34, 1990.
- 97 SCHREIJ, D.; OWENS, C.; THEEUWES, J. Abrupt onsets capture attention independent of top-down control settings. **Percept Psychophys**, v. 70, n. 2, p. 208-18, 2008.
- 98 REES, A.; GREEN, G. G.; KAY, R. H. Steady-state evoked responses to sinusoidally amplitude-modulated sounds recorded in man. **Hear Res**, v. 23, n. 2, p. 123-33, 1986.
- 99 KUWADA, S.; BATRA, R.; MAHER, V. L. Scalp potentials of normal and hearing-impaired subjects in response to sinusoidally amplitude-modulated tones. **Hear Res**, v. 21, n. 2, p. 179-92, 1986.
- 100 ROSS, B.; PICTON, T. W.; PANTEV, C. Temporal integration in the human auditory cortex as represented by the development of the steady-state magnetic field. **Hear Res**, v. 165, n. 1-2, p. 68-84, 2002.

- 101 ROSS, B.; HERDMAN, A. T.; PANTEV, C. Stimulus induced desynchronization of human auditory 40-Hz steady-state responses. **J Neurophysiol**, v. 94, n. 6, p. 4082-93, 2005.
- 102 BREGMAN, A. **Auditory Scene Analysis: The Perceptual Organization of Sound**. A Bradford Book, 1994.
- 103 BREGMAN, A. S. Auditory Scene Analysis and the Role of Phenomenology in Experimental Psychology. **Canadian Psychology/Psychologie canadienne**, v. 46, n. 1, p. 32-40, 2005.
- 104 ROSS, B. et al. The effect of attention on the auditory steady-state response. **Neurology & clinical neurophysiology : NCN**, v. 2004, p. 22, 2004.
- 105 BIDEET-CAULET, A. et al. Effects of selective attention on the electrophysiological representation of concurrent sounds in the human auditory cortex. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 35, p. 9252-9261, 2007.
- 106 SKOSNIK, P.; KRISHNAN, G.; O'DONNELL, B. The effect of selective attention on the gamma-band auditory steady-state response. **Neuroscience letters**, v. 420, n. 3, p. 223-228, 2007.
- 107 MÜLLER, N. et al. Top-down modulation of the auditory steady-state response in a task-switch paradigm. **Frontiers in human neuroscience**, v. 3, p. 1, 2009.
- 108 GANDER, P. E.; BOSNYAK, D. J.; ROBERTS, L. E. Acoustic experience but not attention modifies neural population phase expressed in human primary auditory cortex. **Hear Res**, v. 269, n. 1-2, p. 81-94, 2010.
- 109 PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Deluxe Fourth Edition (with CD-ROM)**. {Academic Press}, 1998.
- 110 JIANGTAO, X.; CHICHARO, J. F. A new algorithm for improving the accuracy of periodic signal analysis. **Instrumentation and Measurement, IEEE Transactions on**, v. 45, n. 4, p. 827-831, 1996.
- 111 ROACH, B. J.; MATHALON, D. H. Event-Related EEG Time-Frequency Analysis: An Overview of Measures and An Analysis of Early Gamma Band Phase Locking in Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 34, n. 5, p. 907-926, September 1, 2008 2008.

- 112 FISHER, N. I. **Statistical Analysis of Circular Data**. Cambridge University Press, 1996.
- 113 TALLON-BAUDRY, C. et al. Oscillatory gamma-band (30-70 Hz) activity induced by a visual search task in humans. **J Neurosci**, v. 17, n. 2, p. 722-34, 1997.
- 114 MARK, R. G.; HALL, R. D. Acoustically evoked potentials in the rat during conditioning. **J Neurophysiol**, v. 30, n. 4, p. 875-92, 1967.
- 115 WEINBERGER, N. M. et al. Gamma band plasticity in sensory cortex is a signature of the strongest memory rather than memory of the training stimulus. **Neurobiol Learn Mem**, v. 104, p. 49-63, 2013.
- 116 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, 2012.
- 117 FAYE-LUND, H.; OSEN, K. K. Anatomy of the inferior colliculus in rat. **Anat Embryol**, v. 171, n. 1, p. 1-20, 1985.
- 118 GALAMBOS, R.; MAKEIG, S.; TALMACHOFF, P. J. A 40-Hz auditory potential recorded from the human scalp. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 4, p. 2643-7, 1981.
- 119 JACOBSON, G.; GRAYSON, A. The normal scalp topography of the middle latency auditory evoked potential Pa component following monaural click stimulation. **Brain Topography**, v. 1, n. 1, p. 29-36, 1988/09/01 1988.
- 120 FLORENTINE, M.; FASTL, H.; BUUS, S. Temporal integration in normal hearing, cochlear impairment, and impairment simulated by masking. **J Acoust Soc Am**, v. 84, n. 1, p. 195-203, 1988.
- 121 HACKLEY, S. A.; WOLDORFF, M.; HILLYARD, S. A. Cross-modal selective attention effects on retinal, myogenic, brainstem, and cerebral evoked potentials. **Psychophysiology**, v. 27, n. 2, p. 195-208, 1990.
- 122 RINNE, T. et al. Auditory selective attention modulates activation of human inferior colliculus. **J Neurophysiol**, v. 100, n. 6, p. 3323-7, 2008.

- 123 GRAY, C. M.; SINGER, W. Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 5, p. 1698-702, 1989.
- 124 MCDONALD, A. J. Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. **J Comp Neurol**, v. 365, n. 3, p. 367-79, 1996.
- 125 ODA, Y. et al. Gamma band neural synchronization deficits for auditory steady state responses in bipolar disorder patients. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. 5, 2012.
- 126 NOBRE, M. J.; BRANDAO, M. L. Modulation of auditory-evoked potentials recorded in the inferior colliculus by GABAergic mechanisms in the basolateral and central nuclei of the amygdala in high- and low-anxiety rats. **Brain Res**, v. 3, p. 20-9, 2011.
- 127 DISTERHOFT, J. F.; STUART, D. K. Trial sequence of changed unit activity in auditory system of alert rat during conditioned response acquisition and extinction. **J Neurophysiol**, v. 39, n. 2, p. 266-81, 1976.
- 128 KRAUS, N.; DISTERHOFT, J. F. Response plasticity of single neurons in rabbit auditory association cortex during tone-signalled learning. **Brain Research**, v. 246, n. 2, p. 205-215, 1982.
- 129 OLESON, T. D.; ASHE, J. H.; WEINBERGER, N. M. Modification of auditory and somatosensory system activity during pupillary conditioning in the paralyzed cat. **J Neurophysiol**, v. 38, n. 5, p. 1114-39, 1975.
- 130 EDELINE, J.-M.; NEUENSCHWANDER-EL MASSIOUI, N.; DUTRIEUX, G. Frequency-specific cellular changes in the auditory system during acquisition and reversal of discriminative conditioning. **Psychobiology**, v. 18, n. 4, p. 382-393, 1990.
- 131 MA, X.; SUGA, N. Plasticity of bat's central auditory system evoked by focal electric stimulation of auditory and/or somatosensory cortices. **J Neurophysiol**, v. 85, n. 3, p. 1078-87, 2001.
- 132 YAN, J.; ZHANG, Y.; EHRET, G. Corticofugal shaping of frequency tuning curves in the central nucleus of the inferior colliculus of mice. **J Neurophysiol**, v. 93, n. 1, p. 71-83, 2005.

- 133 YAN, J.; EHRET, G. Corticofugal modulation of midbrain sound processing in the house mouse. **Eur J Neurosci**, v. 16, n. 1, p. 119-28, 2002.
- 134 NAKAMOTO, K. T.; JONES, S. J.; PALMER, A. R. Descending projections from auditory cortex modulate sensitivity in the midbrain to cues for spatial position. **J Neurophysiol**, v. 99, n. 5, p. 2347-56, 2008.
- 135 ZHOU, X.; JEN, P. H. Corticofugal modulation of directional sensitivity in the midbrain of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. **Hear Res**, v. 203, n. 1-2, p. 201-15, 2005.
- 136 GAO, E.; SUGA, N. Experience-dependent corticofugal adjustment of midbrain frequency map in bat auditory system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 21, p. 12663-70, 1998.
- 137 YAN, W.; SUGA, N. Corticofugal modulation of the midbrain frequency map in the bat auditory system. **Nat Neurosci**, v. 1, n. 1, p. 54-8, 1998.
- 138 BAJO, V. M. et al. The descending corticocollicular pathway mediates learning-induced auditory plasticity. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 2, p. 253-60, 2010.
- 139 BIRT, D.; NIENHUIS, R.; OLDS, M. Separation of associative from non-associative short latency changes in medial geniculate and inferior colliculus during differential conditioning and reversal in rats. **Brain Research**, 1979.
- 140 BIRT, D.; OLDS, M. Associative response changes in lateral midbrain tegmentum and medial geniculate during differential appetitive conditioning. **J Neurophysiol**, v. 46, n. 5, p. 1039-55, 1981.
- 141 OLDS, J. et al. Learning centers of rat brain mapped by measuring latencies of conditioned unit responses. **J Neurophysiol**, v. 35, n. 2, p. 202-19, 1972.

8 ANEXO I

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 133/2010**, relativo ao projeto intitulado "*Potenciais evocados auditivos de Estado Estável no Estudos dos substratos neurais envolvidos nos processos de aprendizagem e memória*", que tem como responsável(is) **Márcio Flávio Dutra Moraes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 08/2010**.

Este certificado expira-se em **11/ 08/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 133/2010**, related to the project entitled "*Auditory steady state evoked responses in the study of the neural substrates involved in memory and learning process*", under the supervisors of **Márcio Flávio Dutra Moraes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 11, 2010**.

This certificate expires in **August 11, 2015**.

Belo Horizonte, 13 de Agosto de 2010.

Prof^ª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br