

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Neurociências

Avaliação cognitiva e de respostas evocadas auditivas em regime permanente do rato Wistar audiogênico.

Hyorrana Priscila Pereira Pinto

Belo Horizonte

2018

Hyorrana Priscila Pereira Pinto

Avaliação cognitiva e de respostas evocadas auditivas em regime permanente do rato Wistar audiogênico.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de doutor.

Linha de pesquisa: Neurociências molecular, sistêmica, comportamental e computacional

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

Belo Horizonte

2018

Este trabalho foi desenvolvido no **Núcleo de Neurociências** da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo Programa de Pós-graduação em Neurociências, 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.

043 Pinto, Hyorrana Priscila Pereira.
Avaliação cognitiva e de respostas evocadas auditivas em regime permanente do rato Wistar audiogênico [manuscrito] / Hyorrana Priscila Pereira Pinto. – 2018.

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

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes.

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

1. Neurociências - Teses. 2. Epilepsia. 3. Comprometimento cognitivo. 4. Ratos Wistar. 5. Potenciais evocados auditivos. I. Moraes, Márcio Flávio Dutra. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8

Dedico este trabalho à minha mãe. Todo passo dado é por você.

AGRADECIMENTOS

Confesso que em vários momentos, apesar de muito estudo, trabalho e esforço, acreditei que não conseguiria finalizar meu doutorado. Escrevendo esta tese, me passou pela memória todos os muitos obstáculos, desafios e empecilhos que permearam minha trilha, mas sem dúvida alguma, foram os mesmos que tornaram cada resultado alcançado muito mais gratificante e de extrema felicidade. A finalização do meu doutorado vai muito além de um passo dado, sendo para mim e para muitos que me amam a realização de um sonho. Nesta caminhada tive o apoio e o prazer de conviver com várias pessoas importantes e gostaria de agradecer-las pela contribuição ao longo de todos estes anos.

Agradeço muito ao Núcleo de Neurociências (NNC). Fazer parte deste grupo foi uma honra! Tenho muito orgulho de dizer que fiz parte desta equipe tão competente e concisa. Aprendi muito com vocês e espero repassar todo o conhecimento e vontade de fazer ciência adiante. Sempre me lembrarei com carinho de vocês. Muito obrigada!

Agradeço também a todos os professores do NNC pelo apoio ao longo de toda a minha formação: Bruno Rezende, Cleiton Aguiar, André Massenssini e Juliana Tavares, mas em especial aos professores Grace e Márcio Moraes.

Professor Márcio, te agradeço muito pela orientação e oportunidade de trabalhar com vocês. Me sinto honrada por dizer que fiz parte do NNC e por ter convivido e aprendido com tantos profissionais competentes e comprometidos com o que fazem. Obrigada por cada discussão científica e reuniões intermináveis que sempre sanavam minhas dúvidas e acrescentavam em minha formação. Sua vontade de fazer ciência e seu raciocínio rápido sempre me estimularam e me incentivaram ao longo da minha trajetória. Muito obrigada!

Professora Grace, eu sempre vou te agradecer em pensamento por ter me respondido aquele *e-mail* e ter me fornecido a oportunidade de poder fazer ciência. Mesmo de longe, você sempre me acolheu, me fortaleceu e me ajudou a seguir adiante. Nossas poucas, mas muito importantes, reuniões em sua sala foram essenciais. Obrigada por ser essa mãezona de todos nós e por torcer para nosso sucesso dentro e fora do laboratório. Muito obrigada!

Agradeço também ao Paulo Aparecido Amaral Jr. pela companhia sempre agradável, pelo apoio e principalmente por ter nos ajudado na construção de aparatos científicos que deram a oportunidade de vários alunos desenvolverem seus projetos no NNC. Muito obrigada Paulete!

Agradeço a Ana Flávia Santos Almeida por ter surgido em minha trajetória no momento exato! Muito obrigada pelo aprendizado, exemplo de responsabilidade e trabalho. Sua amizade e companheirismo trouxeram resultados importantes que me deram uma dose a mais de estímulo. Sempre lembrarei com muito carinho de você. Muito obrigada!

Agradeço a minha mãe, Aparecida, por ser meu exemplo de perseverança e amor. Agradeço por estar sempre ao meu lado, me fortalecendo frente a cada obstáculo e comemorando comigo cada avanço e conquista. Sigo na certeza de que os frutos estão por vir e faremos juntas estas colheitas. Obrigada por sempre apoiar os meus sonhos e em alguns momentos abrir mão dos seus para que eu pudesse realizar os meus. Você é o meu amor maior.

Agradeço também a família Bonfá por estarem sempre presentes e por se tornarem a minha família em Belo Horizonte. Todos os domingos compartilhados com vocês foram essenciais para que eu renovasse minhas energias para retomar a rotina de muito trabalho. Muito obrigada!

Agradeço também a família que conquistei ao longo destes anos na UFMG: Nayara Horta, Thais Santana, Luciana de Mello e Samara Damasceno. Vocês foram um dos melhores presentes que a vida me deu. Obrigada por fazerem parte do meu dia a dia e por tornarem minha rotina muito mais alegre! Amo vocês.

Obrigada ao *Darkside* por ter compartilhado momentos de sabedoria e conhecimentos na eletrofisiologia e na vida. Em especial, agradeço a meu querido amigo Vinícius Rezende (fiel escudeiro desde o mestrado), Flávio Mourão, Daniel Medeiros e Cristiano Simões. Foi muito bom conviver diariamente com vocês por todos esses anos. Obrigada!

Agradeço ao colegiado de Neurociências pelo aprendizado em todas as nossas reuniões. Discutir os problemas vinculados a ciência me fizeram ver os problemas de outro ângulo, me tornando muito mais madura e consciente. Muito obrigada pela oportunidade!

Agradeço muito aos bioteristas Silvio, Samir e Cássio pela ajuda na manutenção da colônia dos WAR. Aprendi muito com vocês. Obrigada!

Agradeço também aos técnicos de laboratório Taquinho e Zézé. Obrigada por cada sorriso de “Bom dia”. Vocês são muito queridos por todos nós.

E por fim, agradeço a Deus por me dar a dádiva de viver e por me proteger e me guiar a todo momento.

Muito obrigada!

RESUMO

As crises epiléticas podem causar modificações morfológicas e funcionais no tecido neural, podendo gerar um comprometimento das funções cognitivas. Dentre todas as comorbidades que podem ser geradas como consequência do processo epileptogênico, o comprometimento da memória se destaca, possuindo uma maior prevalência. Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a função cognitiva em um circuito epileptogênico, por meio de potenciais evocados auditivos em regime permanente (PEArp), utilizando-se o modelo animal genético nomeado: rato Wistar audiogênico (WAR). Estes animais apresentam uma convulsão tônico-clônica induzida por estimulação sonora de alta intensidade envolvendo estruturas mesencefálicas, bem como convulsões límbicas, após repetidas estimulações sonoras de alta intensidade: abramamento audiogênico. Com o intuito de respondermos a seguinte hipótese: “A facilitação acústico-límbica do rato Wistar audiogênico prejudica o aprendizado associativo auditivo”, ratos Wistar (n=82) e ratos WAR (n=67) foram submetidos aos seguintes protocolos: (1) Estimulação sonora seguida por análise imunohistoquímica (cFos) para avaliação da hiperexcitabilidade; (2) Testes comportamentais para avaliação da função locomotora; (3) Paradigma de condicionamento ao medo auditivo e contextual e (4) teste de reconhecimento de objeto novo. Nossos resultados eletrofisiológicos e imunohistoquímicos sugerem que há uma hiperexcitabilidade na via acústica do WAR. Ainda, sugerimos que a facilitação acústico-límbica encontrada na circuitaria epileptogênica do WAR prejudica o aprendizado associativo aversivo na tarefa de condicionamento auditivo (unimodal), entretanto beneficia o aprendizado na tarefa de condicionamento ao medo contextual (multimodal). Sugerimos que essa ambiguidade de desempenho se deva pela utilização de diferentes circuitos neurais para mediar as respostas condicionadas, bem como pela facilidade de associar o contexto presente no dia do treino, moduladas pelas projeções amigdalares hipersíncronas do WAR.

ABSTRACT

Seizures can cause morphological and functional changes in neural tissue, and may lead to cognitive functions impairment. Among all the comorbidities that can be generated as a consequence of the epileptogenic process, the memory impairment stands out, having a higher prevalence. Thus, this work was developed with the objective to assess the cognitive function in an epileptogenic circuitry, with concomitant recordings of auditory steady state responses (ASSR), using the genetic animal model named: Wistar audiogenic rat (WAR). These animals manifest a tonic-clonic convulsion induced by repeated high-intensity sound stimulation involving mesencephalic substrates, as well as limbic seizures, after chronically applied high-intensity stimulation: audiogenic kindling. In order to answer the following hypothesis: "WARs acoustic-limbic facilitation harms auditory associative learning", Wistar rats (n = 82) and WARs (n = 67) were submitted to the following protocols: Sound stimulation followed by immunohistochemical analysis (cFos) to evaluate hyperexcitability; (2) Behavioral tests for locomotor function evaluation; (3) auditory and contextual fear conditioning and (4) new object recognition test. Our electrophysiological and immunohistochemical results suggest that there is a hyperexcitability in the acoustic pathway of WAR. We suggest that acoustic-limbic facilitation in WARs impairs learning on the auditory conditioning fear learning, but benefits the contextual conditioning fear learning. We suggest that this ambiguity of performance is due to the use of different neural circuits to mediate the conditioned responses, as well as the facility to associate the context present on the training day, modulated by WAR's hypersynchronous amygdalar projections.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Paradigma do condicionamento ao medo	27
Figura 02: O papel da amígdala no condicionamento ao medo clássico.....	30
Figura 03: Circuitaria neural envolvida no condicionamento ao medo contextual.....	36
Figura 04: Cirurgia estereotáxica para implantes de eletrodos profundos.....	60
Figura 05: Desenho esquemático do protocolo de condicionamento ao medo auditivo	62
Figura 06: Caixa de condicionamento criada no Núcleo de Neurociências	63
Figura 07: Desenho esquemático do protocolo de condicionamento ao medo contextual.....	73
Figura 08: Expressão de c-Fos nas regiões de interesse analisadas.....	78
Figura 09: Desempenho dos animais no Teste de campo aberto.....	79
Figura 10: Desempenho dos animais no Teste Rotarod.....	80
Figura 11: Desempenho dos animais no Teste de assimetria bilateral.....	81
Figura 12: Porcentagem de comportamento de congelamento durante as apresentações do EC no protocolo de condicionamento ao medo auditivo no grupo não pareado e pareado.....	82
Figura 13: Confirmação do posicionamento dos eletrodos de registro.....	83
Figura 14: Imagem ilustrativa do Potencial de campo local e espectograma dos PEArp do CI de um animal controle (WIS).....	85
Figura 15: Imagem ilustrativa do Potencial de campo local e espectograma dos PEArp do CI de um animal experimental (WAR).....	86
Figura 16: Caracterização dos PEArp do CI no grupo pareado do Protocolo de condicionamento ao medo auditivo.....	88
Figura 17: Caracterização dos PEArp do CI no grupo não pareado do Protocolo de condicionamento ao medo auditivo.....	88

Figura 18: Figura ilustrativa dos valores do PLV, de um animal controle (WIS), durante a apresentação do EC no PT e no TT. PEArp registrado no CI.....	90
Figura 19: Figura ilustrativa dos valores do PLV, de um animal experimental (WAR), durante a apresentação do EC no PT e no TT. PEArp registrado no CI.....	90
Figura 20: Caracterização dos PEArp do LA no grupo pareado do Protocolo de condicionamento ao medo auditivo.....	93
Figura 21: Caracterização dos PEArp do LA no grupo não pareado do Protocolo de condicionamento ao medo auditivo.....	93
Figura 22: Figura ilustrativa dos valores do PLV, de um animal controle (WIS), durante a apresentação do EC no PT e no TT. PEArp registrado no LA.....	94
Figura 23: Figura ilustrativa dos valores do PLV, de um animal controle (WAR), durante a apresentação do EC no PT e no TT. PEArp registrado no LA.....	94
Figura 24: Média das Anorm da composição espectral a partir do registro no CI durante o PT e TT nos grupos pareado e não pareado.....	96
Figura 25: Média das Anorm da composição espectral a partir do registro no LA durante o PT e TT nos grupos pareado e não pareado.....	97
Figura 26: Porcentagem de comportamento de congelamento durante o protocolo de condicionamento contextual no grupo controle e experimental.....	99
Figura 27: Desempenho dos animais no Teste de reconhecimento de objeto novo.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Animais utilizados no “Protocolo de estimulação sonora seguida por análise de imunohistoquímica.....	52
Tabela 02: Animais utilizados no “Protocolo de condicionamento ao medo auditivo”.....	58
Tabela 03: Animais utilizados no “Protocolo de condicionamento ao medo contextual”.....	72
Tabela 04: Animais utilizados no “Protocolo de reconhecimento de objeto novo”.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: abrasamento audiogênico	LFP: <i>local field potential</i>
Ab: amplitude basal	LTA: lobo temporal auditivo
AM: tons modulados em amplitude	LTP: potenciação de longo prazo
AMY: complexo amigdalóide	mCPF: córtex pré-frontal medial
Anorm: amplitude normalizada	mLA: sub-núcleo medial do núcleo lateral do complexo amigdalóide
ASSR: <i>auditory steady state response</i>	NNC: Núcleo de Neurociências
BA: núcleo basal do complexo amigdalóide	PC: <i>place cells</i>
BLA: núcleo basolateral do complexo amigdalóide	PEA: potenciais evocados auditivos
CA: crises audiogênicas	PEArp: potencial evocado auditivo em regime permanente
CeA: núcleo central do complexo amigdalóide	PEAt: potencial evocado auditivo transitório
CI: núcleo central do colículo inferior	PILO: pilocarpina
CPF: córtex pré-frontal	PT: pré treino
DAE: drogas antiepiléticas	PTZ: pentilenotetrazol
dLA: sub-núcleo dorsal do núcleo lateral do complexo amigdalóide	RC: resposta condicionada
EC: estímulo condicionado	RON: Teste de Reconhecimento de objeto novo
EEG: eletroencefalograma	SOMoff: grupo sem estimulação sonora
ENC: estímulo não condicionado	SOMon: grupo com estimulação sonora
fp: frequência portadora	TR: treino
fm: frequência moduladora	TT: teste
IED: descargas interictais	vILA: sub-núcleo ventrolateral do núcleo lateral do complexo amigdalóide
IG: índice de gravidade	WAR: rato Wistar audiogênico
IR: índice de reconhecimento de objeto	WIS: rato Wistar
LA: núcleo lateral do complexo amigdalóide	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1.EPILEPSIA	14
1.2.MODELOS ANIMAIS GENÉTICOS DE CRISES AUDIOGÊNICAS.....	16
1.3. COMPROMETIMENTO COGNITIVO E COMORBIDADES EM EPILEPSIA	20
1.4.MEMÓRIA.....	24
1.4.1. CONDICIONAMENTO AO MEDO AUDITIVO.....	26
1.4.2. CONDICIONAMENTO AO MEDO CONTEXTUAL.....	33
1.5.POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS	37
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1.OBJETIVO GERAL	43
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. DIRETRIZES ÉTICAS	45
4.2.SUJEITOS EXPERIMENTAIS	46
4.3. MANUTENÇÃO DA COLÔNIA WAR	47
4.4.GRUPOS EXPERIMENTAIS	49
4.5.ESTIMULAÇÃO SONORA UTILIZANDO RESPOSTAS EVOCADAS EM REGIME PERMANENTE	51
4.6.PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	52
4.6.1. GRUPO 01: PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO SONORA SEGUIDA POR ANÁLISE DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA cFOS	52
4.6.1.1.PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO SONORA	52
4.6.1.2.PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA Cfos	54
4.6.1.3.ANÁLISE DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA cFOS	56
4.6.2. GRUPO 02: PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO AUDITIVO	58
4.6.2.1. Cirurgia para implantação de eletrodos profundos.....	59
4.6.2.2. Paradigma de condicionamento ao medo auditivo.....	61
4.6.2.3. Registros eletrofisiológicos.....	64
4.6.2.4. Processamento digital dos sinais	65
4.6.2.5. Análise histológica: posicionamento dos eletrodos profundos	67

4.6.3. GRUPO 03: PROTOCOLOS COMPORTAMENTAIS CONTROLE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA	69
4.6.3.1. Teste de Assimetria bilateral	69
4.6.3.2. Teste de Campo aberto	70
4.6.3.3. Teste de Rotarod	71
4.6.4. GRUPO 04: PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO CONTEXTUAL	72
4.6.5. GRUPO 05: PROTOCOLO DE RECONHECIMENTO DE OBJETO NOVO	74
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	76
5. RESULTADOS	77
6. DISCUSSÃO	101
7. CONCLUSÃO	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
9. ANEXOS	121

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPILEPSIA

A atividade neuronal coordenada juntamente com as interações entre as diferentes populações de neurônios são fatores básicos que determinam a função cerebral fisiológica (Buzsaki, 2006). No cérebro saudável, para que o processo cognitivo ocorra de uma forma adequada, uma sincronização precisa da atividade neural é requisitada, podendo ocorrer entre milissegundos a horas, bem como entre pequenas e longas distâncias cerebrais (Varela, 2001). No entanto, a alteração desta sincronização pode gerar várias disfunções neurológicas e psiquiátricas, como por exemplo, a epilepsia (Uhlhaas, 2006).

As convulsões epiléticas podem ser interpretadas como uma atividade cerebral altamente sincronizada, caracterizada por inibição diminuída e excitação exacerbada, gerando como consequência uma condição transitória e intensa de hipersincronização, manifestando descargas epiléticas rítmicas de alta amplitude (Penfield, 1954; Fisher, 2005). O termo epilepsia, por sua vez, refere-se a uma doença neural que apresenta uma tendência patológica e contínua em manifestar convulsões epiléticas (Fisher, 2014).

Alguns estudos sugerem que as convulsões epiléticas podem gerar atratores neurais que poderiam “sequestrar” outros osciladores cerebrais funcionais para sua sincronização anormal (Beenhakker & Huguenard, 2009). Sabe-se que esta hipersincronização é de extrema importância para manutenção e propagação da crise epilética, uma vez que quando são feitas transecções entre projeções distintas que conectam diferentes substratos cerebrais, os disparos epileptiformes se manifestavam em menor intensidade e de forma dessincronizada (Imamura, 2001; Guzman, 2004).

Ainda, sabe-se que o cérebro disfuncional pode comprometer a dinâmica neural fisiológica em processos específicos de processamentos sensoriais através do acoplamento exacerbado de populações neuronais (Pinto, 2017).

1.2. MODELOS ANIMAIS GENÉTICOS DE CRISES AUDIOGÊNICAS

A compreensão dos mecanismos subjacentes a epileptogênese e a ictogênese não podem ser adquiridas por completo em estudos clínicos em humanos. Dessa forma, modelos animais para crises epiléticas e epilepsia desempenham um papel fundamental no entendimento das mudanças comportamentais e fisiológicas associadas a epilepsia humana (Castro, 2015; Pinto, 2017; Vilela, 2017).

O modelo animal genético utilizado neste trabalho é nomeado: modelo de crises epiléticas audiogênicas (CA) reflexas (Garcia-Cairasco, 2017). Estas são classificadas como crises epiléticas generalizadas provocadas por estimulação acústica de alta intensidade (110dB). A ativação das vias auditivas é crucial para o desenvolvimento da CA, sendo que o colículo inferior (CI), localizado no mesencéfalo, desempenha um papel chave na iniciação da CA (Garcia-Cairasco, 2002; Garcia-Cairasco, 1993).

Com o passar dos anos, várias cepas audiogênicas foram criadas, sendo elas: Krushinsky-Molodkina na Rússia (Krushnsky, 1949), Genetically Epilepsy-Prone Rat nos Estados Unidos (Jobe, 1973), ratos P77PMC na China (Zhao, 1985), ratos Wistar albino Glaxo/Rijwijk (WAG/Rij) na Holanda (van Luijtelaar, 1986), Wistar Audiogenic Sensitive Rat na França (Marescaux, 1987) e os ratos Wistar audiogênicos (WAR) no Brasil (Doretto, 2003). Em animais susceptíveis audiogênicos, um estímulo acústico único engatilha uma convulsão reflexa, mimetizando as crises epiléticas vistas nos humanos. Normalmente estas convulsões se iniciam com uma corrida, chamada de *wild running*, progredindo para a fase tônico-clônica (Ross, 2000).

Dentre os modelos mencionados que podem reproduzir a CA, selecionamos a linhagem do rato Wistar audiogênico (WAR). Nestes animais, as crises generalizadas tônico-clônicas seguidas por espasmos clônicos são preservadas mesmo após total

remoção do prosencéfalo, ressaltando a natureza mesencefálica das CAs nos WARs (Moraes, 2000b; Doretto, 2003). Ademais, a estimulação acústica pode ser aplicada a estas cepas a partir de um protocolo intermitente crônico chamado abrasamento audiogênico (AA) (Kiesmann, 1988). O protocolo de AA modifica o comportamento e a expressão do eletroencefalograma (EEG) das CA, recrutando-se circuitos límbicos nas cepas audiogênicas (Moraes, 2000).

O índice de gravidade (IG) Garcia-Cairasco (1996), variando de 0-1, é utilizado para quantificar o envolvimento de estruturas de tronco nas CAs, enquanto a escala Racine (1972), variando de 0-5, é utilizada para quantificar o envolvimento das estruturas límbicas. O índice utilizado para quantificar as CAs pode ser resumidamente, aplicado da seguinte forma: ratos que não desenvolverem mudanças comportamentais frente ao estímulo provocador alcançarão um índice de gravidade (IG) equivalente a 0.0, enquanto animais que desenvolverem episódios de corridas, pulos e quedas atônicas, procedidas por crises tônico-clônicas e espasmos clônicos alcançam um $IG \geq 0.85$. Hiperextensão de membros anteriores e posteriores atrelados à flexão ventral da cabeça são comportamentos que alcançam o valor de $IG=1.00$ (Garcia-Cairasco, 1993; Magalhaes, 2004; Pinto, 2017). Já a sequência comportamental padronizada por Racine pode ser observada através das seguintes manifestações: atitude estacionária com a cabeça estendida (classe 0), desenvolvendo para automatismos faciais (classe 1), mioclonias da cabeça (classe 2), mioclonia unilateral/bilateral de patas anteriores (classe 3), mioclonias de patas anteriores com sustentação do corpo sobre as patas posteriores (rearing, classe 4) e mioclonias de patas anteriores com sustentação do corpo sobre as patas posteriores seguida por perda de equilíbrio e generalização (classe 5) (Racine, 1972; Moraes, 2000a).

A combinação do IG de tronco e IG límbica evidencia uma evolução comportamental durante o AA em WARs, não sendo esta uma expressão linear de um

simples sistema de vias. Na verdade, a via de tronco estende-se rostralmente por meio do recrutamento límbico, sendo que ambas as vias conectam-se bi-direcionalmente. Existe um sistema de feedback negativo bidirecional das vias límbicas e audiogênicas, justificando-se pelo decréscimo da atividade epileptiforme do colículo inferior após o recrutamento prosencefálico (Moraes, 2000a).

Esta alternância entre as redes neurais de prosencéfalo e mesencéfalo poderia ser explicada por uma predisposição à crises epiléticas de vários substratos neurais do cérebro do WAR (Scarlatelli-Lima, 2003). Além disso, estes animais apresentam sensibilidade anormal a uma variedade de estímulos provocadores da crise epilética, incluindo o eletrochoque e drogas, tais como o pentilenotetrazol (PTZ) e a pilocarpina (PILO), sugerindo a existência de uma circuitaria neural epileptogênica hereditária de baixo limiar (Scarlatelli-Lima, 2003).

Dois substratos neurais foram sugeridos como cruciais para o desencadeamento das CAs e límbicas, sendo eles o colículo inferior (CI) (Faingold, 1999; Moraes, 2000b; Garcia-Cairasco, 2002) e o complexo amigdalóide (AMY) (Hirsch, 1992; Hirsch, 1997; Moraes, 2000), respectivamente. Dentre as estruturas de tronco encefálico, em uma visão ascendente, o CI tem se mostrado a área mais rostral necessária para origem e desencadeamento das CAs.

Na via auditiva, o CI é visto como um substrato essencial para a audição (Oliver, 1991). Situado relativamente nos estágios medianos da via auditiva, o CI é considerado uma área do tronco cerebral na qual uma integração multissensorial ocorre, possuindo conexões com o sistema límbico, motor e sensorial (Winer, 2005; Gruters, 2012). Estudos demonstram que o CI é o substrato da via auditiva que possui mais conexões com outros substratos neurais (Bajo, 2013). Estas incluem aferências provenientes do núcleo coclear, complexo olivar, núcleo do lemnisco lateral e de todas as áreas corticais auditivas. Além

destas projeções extrínsecas, existe também um rico arranjo de projeções comissurais e intrínsecas. O CI possui projeções para praticamente todos os núcleos do tronco encefálico que projetam para ele, podendo também enviar projeções axoniais para o tálamo auditivo (Oliver, 1991; Winer, 2005; Gruters, 2012).

O CI possui três divisões principais: núcleo central, núcleo lateral e córtex dorsal. Cada divisão possui vários núcleos que diferem em suas estruturas neuronais, conexões e em seus papéis funcionais. O núcleo central é exclusivamente auditório e é essencial para a audição normal. O núcleo lateral é multissensorial e considerado como o alvo para aferências não-auditórias. O córtex dorsal recebe a maioria de suas projeções do córtex cerebral (Kudo, 1980; Calford, 1983).

Vários estudos no contexto da ictogênese vêm mostrando que lesões bilaterais no CI bloquearam completamente a expressão das CAs em roedores (Garcia-Cairasco, 1993; Garcia-Cairasco, 2002). Já o AMY tem se mostrado a estrutura na qual as vias de tronco encefálico e prosencefálica se interagem (Hirsch et al., 1997; Moraes, 2000).

Dessa forma, todos os dados mencionados sugerem que não somente as vias neurais de tronco encefálico, mas também as vias neurais límbicas exibem uma atividade epileptiforme facilitada quando estimuladas nos WARs. Pode-se fundamentar dessa forma que projeções acústico-límbicas nos WARs são mais susceptíveis ao recrutamento quando comparado aos controles ratos Wistar.

1.3. COMPROMETIMENTO COGNITIVO E COMORBIDADES EM EPILEPSIA

As consequências desta hiperexcitação e hipersincronismo encontrados nos circuitos neurais de pessoas que possuem a epilepsia vão muito além das crises epiléticas. Uma importante consequência é o comprometimento da função cognitiva, sendo esta definida como a capacidade do cérebro de se programar frente ao comportamento adaptativo, resolver problemas, memorizar informações e possuir o foco atencional (Aldenkamp, 2006; Rijckvorsel, 2006).

A epilepsia pode ser interpretada como um sinal das disfunções cerebrais ictais e interictais (Aldenkamp, 2006). Assim, parece óbvio que o comprometimento cognitivo se desenvolva como um sintoma secundário à epilepsia, uma vez que as crises epiléticas podem causar modificações morfológicas e funcionais no tecido neural (Aldenkamp, 2006; Rijckvorsel, 2006). A anóxia, a acidose láctica ou a liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios por convulsões consecutivas ou prolongadas podem danificar permanentemente o substrato neural, resultando em danos cognitivos (Kim, 2016). O comprometimento da memória, a lentificação mental e os déficits atencionais são as desordens mais frequentes associadas à epilepsia, podendo ser acompanhadas por depressão, ansiedade e psicoses (Miller, 2016; Greener, 2013; Cardamone, 2013; Hermann, 2007).

A correlação existente entre o declínio cognitivo e a epilepsia é complexa e ainda não completamente entendida. Porém, a literatura disponível no âmbito da epileptogênese vem demonstrado a existência de alguns fatores de risco potenciais para o comprometimento cognitivo em pacientes portadores da epilepsia, emergentes da interação sinérgica entre as lesões, as convulsões e o tratamento (Witt, 2013; Greener,

2013). As drogas antiepiléticas (DAE), utilizadas como a intervenção terapêutica principal na epilepsia, reduzem a irritabilidade neuronal, podendo reduzir a excitabilidade neural e comprometer a cognição (Kim, 2016). Em geral, a politerapia, dosagens crescentes de DAEs e níveis sanguíneos elevados de anticonvulsivantes aumentam o risco e comprometimento a longo-prazo comportamental e cognitivo em humanos (Bromley, 2011; Ijff, 2013).

O comprometimento da função cognitiva, especialmente a memória, tem sido um problema comum e incapacitante para indivíduos com epilepsia de lobo temporal (TLE) (Hermann, 2006). Como um exemplo deste comprometimento, podemos citar o trabalho da *Gelinas* (2016), o qual mostra que a atividade neural patológica ocorrente entre as convulsões, em sua maioria as descargas interictais (IED), contribuem para esta disfunção cognitiva. A comunicação hipocampo-cortical eficaz é necessária para gerar-se uma memória eficiente. Três padrões de atividades neurais, bem como o acoplamento fisiológico entre eles, são cruciais para a consolidação da memória, sendo eles: as oscilações (*ripples*) hipocampais, oscilações lentas neocorticais e fusos de sono neocorticais (*spindles*) (Diekelmann, 2010). As *ripples* hipocampais são breves, oscilantes em alta frequência (100-200Hz) que coordenam e repetem sequências de disparos neurais ordenados relacionados à experiência (Buzsáki, 1989; Wilson, 1994). A eliminação seletiva dessas oscilações prejudicam drasticamente o desempenho de roedores em tarefas de memória (Girardeau, 2009; Jadhav, 2012). Os fusos de sono (*spindles*) NREM são oscilações de baixa frequência (9-16Hz) geradas por vias tálamo-corticais que também estão associadas à repetição sequencial dos disparos neuronais (Johnson, 2010). Durante o sono NREM as *ripples* temporariamente se correlacionam com os fusos de sono via oscilações lentas neocorticais (Battaglia, 2011; Peyrache, 2011). O córtex pré-frontal medial (mCPF) é visto como uma estrutura chave no processamento

de memórias hipocampo-dependentes (Churchwell, 2010), recebendo projeções diretas do hipocampo por meio de uma via com plasticidade sináptica bidirecional (Jay, 1995; Jay, 1991). A co-ativação dessas estruturas (por meio de um acoplamento temporal das *ripples* hipocampais, oscilações neocorticais lentas e *spindles*) são essenciais para a consolidação da memória (Colgin, 2011). Dada a precisa sincronização das oscilações e disparos neurais entre o hipocampo e o mCPF durante o sono NREM, a introdução de sinais anormais nesta via poderia prejudicar seu funcionamento (Colgin, 2011). Similarmente às oscilações fisiológicas (*ripples*), as IEDs encontram-se elevadas durante o sono NREM, podendo competir com as oscilações fisiológicas, comprometendo a comunicação entre o hipocampo e o mCPF, o que por consequência, compromete a consolidação da memória espacial (Gelinas, 2016; Guzman, 2010).

Ainda, alguns estudos, utilizando diferentes modelos animais, demonstraram o comprometimento cognitivo ou a existência de comorbidades em uma rede neural hiperexcitável. Castro *et al* (2015) demonstraram um comportamento do tipo depressivo nos WARs, uma vez que estes animais apresentaram uma latência menor para a imobilidade e um comportamento de imobilidade mais prolongado durante o “Teste do nado forçado”, sugerindo um comportamento do tipo de “desespero” aumentado ou ainda um limiar baixo para avaliar situações de desamparo. Estes dados corroboram com os achados encontrados no modelo animal (WAG/Rij), uma vez que sintomas do tipo depressivo também foram encontrados nesta linhagem (Sarkisova, 2011). Neste mesmo estudo, o WAR apresentou um déficit de aprendizado e memória na tarefa da esquiva ativa de duas vias. Entretanto, em contradição, os mesmos apresentaram aprendizado adequado na tarefa de esquiva passiva, equiparando-se ao grupo controle.

Ainda, no teste de “*Marble burying*” desenvolvido para avaliar comportamentos do tipo obsessivo-compulsivo, ansiedade e neofobia, o WAR foi considerado menos

ansioso em comparação aos ratos resistentes, enterrando menos bolas de gude (Castro, 2015). Ademais, o WAR passou menos tempo nas margens e mais tempo nas áreas mais internas (consideradas áreas mais aversivas) da arena no teste de “Campo aberto”, sugerindo um comportamento menos ansioso em comparação aos ratos resistentes (Castro, 2015). Em contrapartida, outro trabalho sugeriram que o WAR *naive* apresentara comportamentos do tipo ansiedade, avaliado pelo teste “*Elevated plus maze*” (Garcia-Cairasco, 1998).

Dessa forma, fica claro que apesar dos modelos de CA serem amplamente utilizados para caracterização das crises epiléticas reflexas, estes também são muito úteis para avaliação de comorbidades associadas à epilepsia.

Ainda, entre todas as comorbidades que podem ser geradas como consequência do processo epileptogênico, escolhemos avaliar neste trabalho o comprometimento da memória. Foi dada uma maior relevância para a avaliação desta comorbidade devido a sua grande prevalência (Hoppe, 2007; Giovagnoli, 1999; Butler, 2008; Jambaqu, 1993; Schwarcz, 2002).

1.4. MEMÓRIA

A memória é a capacidade que têm o homem e os animais de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente, sendo dividida em três etapas: aquisição, consolidação e evocação (Lent, 2010).

A primeira etapa para a formação de uma memória é a aquisição de informações (aprendizagem) (Izquierdo, 1989; Lent, 2010). Esta pode ser definida como o processamento de um evento qualquer, que está relacionado à memória que será formada, por meio dos sistemas neurais (Izquierdo, 1989; Lent, 2010). Por evento, entendemos qualquer fator memorizável, como por exemplo: um objeto, um som ou um acontecimento (Lent, 2010).

Após a aquisição dos aspectos selecionados de um evento, estes são armazenados por algum tempo, podendo variar de segundos à meses (Rogan, 1997; Peterson, 1966; Lent, 2010). Esse é o processo de consolidação da memória, período no qual uma informação inicialmente nova e lábil torna-se mais concisa, eficiente e mais resistente a interferências (Cellini, 2016; Diekelmann, 2010). Durante esse processo ocorre tanto a indução de mudanças sinápticas de longa duração nos locais onde a representação dos componentes relativos à memória foi formada inicialmente, como em áreas alvo da atividade neural da região primária (Tsvetkov, 2002). O mecanismo celular mais provável para explicar como as memórias são consolidadas é denominado potenciação de longo prazo (do inglês: *long term potentiation* – LTP) (Bear, 1994). Há neste processo um fortalecimento das sinapses, possibilitando o armazenamento das memórias de longo prazo (Huang, 1994; Tsvetkov, 2002). Ainda, tem sido mostrado que o LTP tem um papel fundamental na associação de conjuntos de neurônios específicos que estão envolvidos no traço da memória (engrama) (Wenzel, 1986; Wigstrom, 1986; Kandel,

2014), sendo este definido como a representação física de uma experiência ou evento (Wechsler, 1963; Poulos, 2015). Assim, a memória é evocada quando o traço de memória interage com dicas específicas ou com condições ambientais particulares (Tonegawa, 2015; Schafe, 2005).

Por fim, a última etapa necessária para a formação das memórias é nomeada evocação, na qual as informações aprendidas e armazenadas podem ser lembradas (Han, 2016; Rashid, 2017; Roy, 2017).

Existem várias formas de avaliar o processo de memorização. Este trabalho no entanto, teve o enfoque maior na avaliação da memória associativa, sendo resultante da associação entre dois ou mais estímulos (LeDoux, 2000). Os testes utilizados para avaliar esta memória específica nos ratos Wistar audiogênicos foram o **CONDICIONAMENTO AO MEDO AUDITIVO** e **CONDICIONAMENTO AO MEDO CONTEXTUAL**, detalhados nos tópicos a seguir.

1.4.1. CONDICIONAMENTO AO MEDO AUDITIVO

O condicionamento ao medo clássico, também chamado de condicionamento ao medo auditivo, baseia-se na geração de uma reação defensiva a um estímulo que prediz uma consequência aversiva (Rescorla, 1968; Watson, 1920). Em um experimento típico de condicionamento ao medo, roedores são apresentados a um estímulo emocionalmente neutro (EC), na maioria das vezes um som, que é pareado no tempo com um estímulo não condicionado (ENC) aversivo de choques nas patas (LeDoux, 1988) (Figura 01).

Após o pareamento (associação entre EC-ENC) as apresentações do som (EC) evocam uma série de respostas defensivas que compartilham características similares às respostas de medo inatas, tais como: congelamento (Blanchard, 1969; Fanselow, 1984), alterações do sistema nervoso autônomo (frequência cardíaca, pressão sanguínea e frequência respiratória elevadas) (Stiedl, 1997; Schneiderman, 1974), vocalizações ultrassônicas de angústia a 22kHz (Blanchard, 1991) e potenciação dos reflexos de sobressalto e piscadas de olhos (Lee, 2004; Davis, 1986). Coletivamente, estas respostas são chamadas de respostas condicionadas (RCs) ao medo (McAllister, 1971).

As RCs evocadas pelo EC após o pareamento com o ENC indicam que o aprendizado associativo ocorreu de forma adequada, uma vez que respostas similares não ocorrem quando o EC e ENC não são pareados (Rescorla, 1967).

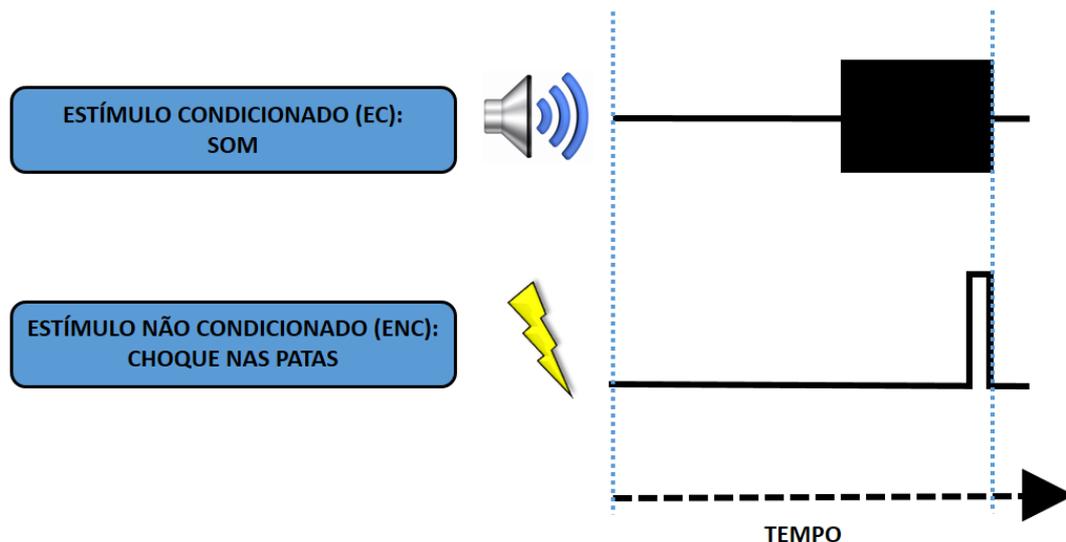


Figura 01: Paradigma do condicionamento ao medo. O condicionamento ao medo clássico envolve o pareamento temporal do estímulo condicionado (EC) emocionalmente neutro, como um som, com um estímulo não condicionado (ENC) aversivo, como um choque nas patas. Após o condicionamento, a apresentação do EC evoca várias respostas de medo, anteriormente não evocadas.

Um vasto número de estudos neurofisiológicos, farmacológicos e por lesões evidenciaram o complexo amigdalóide (AMY) como um substrato neural importante para o condicionamento ao medo (LeDoux, 1996; Fendt, 1999). Sabe-se que este substrato neural, pertencente ao sistema límbico, possui três núcleos principais relacionados ao condicionamento ao medo: o núcleo lateral (LA), o núcleo central (CeA) e o núcleo basal (BA) (Pitkanen, 1997). Destes, o LA tem sido apontado como o componente chave do sistema neurológico responsável pela formação das memórias aversivas (LeDoux, 2000; Fanselow, 1999; Blair, 2001; Maren, 2001).

As aferências auditivas relacionadas ao processamento do EC chegam ao AMY principalmente pelo LA (Romanski, 1993; McDonald, 1998). De forma sumarizada, sabe-se que o tálamo auditivo e o córtex auditivo projetam-se para o LA, (Mascagni, 1993; Romanski, 1993; LeDoux, 1990b) que por sua vez se conecta com o CeA de forma direta ou indireta - via projeções para o BA (Pitkanen, 1997; Pare, 1998).

Já as aferências recrutadas pelo ENC enviam projeções provenientes do trato espino-talâmico para as áreas talâmicas (LeDoux, 1987; LeDoux, 1990b), projetando-se também para o LA, sendo as células deste núcleo responsivas a estimulações auditivas e nociceptivas (Romanski, 1993b). Ainda, áreas corticais responsáveis pelo processamento do estímulo somatossensorial, incluindo o estímulo nociceptivo, também projetam-se para o LA (Romanski, 1993; McDonald, 1998).

Dessa forma, o LA é visto como a área na qual as aferências que processam o EC e ENC se interagem (LeDoux, 1990; Turner, 1991; Romanski, 1993; McDonald, 1998).

No entanto, a convergência do EC-ENC não ocorre no LA inteiramente, uma vez que este consiste de três sub-regiões: dorsal (dLA), ventrolateral (vlLA) e medial (mLA). Estudos sugerem que esta convergência ocorre somente na sub-região dLA, formando o traço de memória do medo nesta região (Pitknen, 1997; Romanski, 1993).

O LA parece ser crítico para a aquisição e retenção do condicionamento ao medo. Lesões eletrolíticas e excitotóxicas ao LA impedem a aquisição e a expressão do condicionamento ao medo (LeDoux, 1990; Campeau, 1995; Amorapanth, 2000). Ainda, a inativação temporária do LA com o muscimol impede o comportamento de congelamento evocado pelo EC (Muller, 1997). De forma semelhante, infusões de bloqueadores dos receptores de NMDA anteriormente ao condicionamento, prejudicam a memória de medo a curto e a longo prazo (Miserendino, 1990; Maren, 1996). Ainda, lesões excitotóxicas do LA, realizadas 16 meses após o condicionamento, interrompem severamente o comportamento de congelamento nos animais (Gale, 2004).

Todavia, não basta apenas que o traço de memória seja formado, a ativação de várias áreas autonômicas e somatossensoriais que medeiam respostas de medo específicas também devem ser ativadas. Estas RCs são moduladas pela estrutura de saída principal

do AMY: o CeA, substrato que recebe aferências nociceptivas da área parabraqueal e medula espinhal (Burstein, 1993). Embora o CeA não receba as principais aferências provenientes das áreas sensoriais que processam o EC sonoro, existem algumas vias diretas de aferências provenientes do LA e de outras regiões do AMY, tais como BA e núcleo basal acessório (ambos recebendo inputs de LA) que se projetam para o CeA (Pitkanen, 1997; Pare, 1998). Apesar dos núcleos LA e CeA se comunicarem de uma forma complexa envolvendo circuitos locais, a projeção direta parece ser suficiente para envio de informações, uma vez que lesões em BA e basal acessória não manifestaram nenhum efeito no condicionamento ao medo auditivo (Nader, 2001; Amorphant, 2000).

Por conseguinte, o CeA envia projeções para áreas do diencéfalo e tronco encefálico que controlam a expressão das respostas de medo (LeDoux, 1988). Enquanto danos ao CeA interferem com a expressão de respostas de medo condicionadas, danos às áreas nas quais o CeA se projeta, interrompem seletivamente a expressão de respostas individuais (LeDoux, 1988; Kapp, 1979). Por exemplo, danos ao hipotálamo lateral afetam a pressão arterial mas não a resposta comportamental de congelamento, ao passo que os danos a substância periaquedutal interferem com o comportamento de congelamento mas não com alterações na pressão arterial (LeDoux, 1988). Similarmente, danos ao *bed nucleus* da estria terminal não possui efeito sobre a pressão arterial ou resposta de congelamento, mas interrompem a liberação condicionada dos hormônios do estresse mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Van de Kar, 1991).

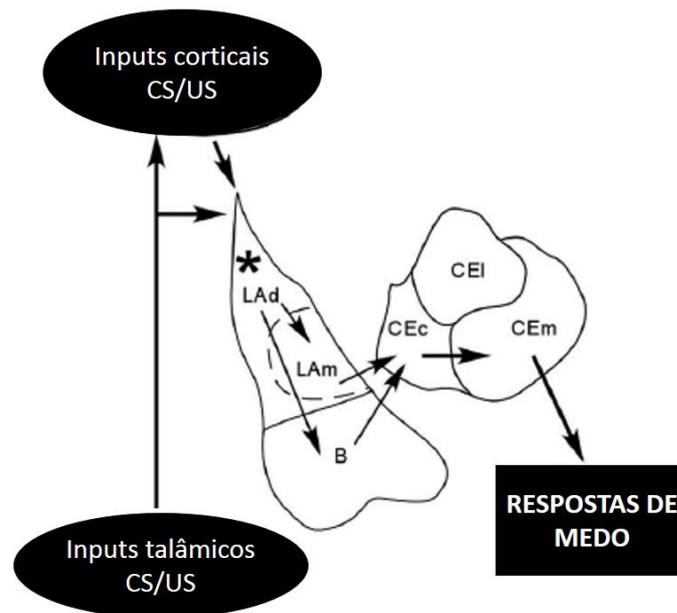


Figura 02: O papel da amígdala no condicionamento ao medo clássico. As informações do EC e ENC percorrem as vias talâmicas e corticais para se convergirem no núcleo LA. A informação é então codificada no subnúcleo LAAd (identificada pelo*). Durante a expressão, a informação sensorial do EC é transmitida do núcleo LA para o núcleo CE, diretamente e indiretamente, passando pelo núcleo B. Logo em seguida, o núcleo CE, maior fonte de vias de saída da amígdala, ativa seus substratos eferentes para que as respostas de medo sejam manifestadas. Figura adaptada de Wilensky, 2006.

Alguns estudos mostraram que as respostas evocadas auditivas unitárias de curta latência (<15 ms) nos neurônios do LA são “fortificadas” após o condicionamento ao medo (Quirk, 1995; Repa, 2001; Collins, 2000). Acredita-se que estas mudanças reflitam uma plasticidade sináptica induzida pelo pareamento associativo entre o som e o choque, tornando o EC relevante após o condicionamento (Collins, 2000). Corroborando com esta hipótese, o pesquisador Rogan *et al.* (1997) avaliou as respostas de campo auditivas no LA, bem como a RC (congelamento) após o condicionamento ao medo. Foi encontrado um aumento da amplitude e da inclinação (*slope*) dessas respostas evocadas, atrelada a manifestação do comportamento de congelamento. Ainda, pode-se notar que apresentações não pareadas do EC e ENC não produziram aumentos destas respostas.

Após a realização de vários estudos para entender essas alterações nas respostas evocadas auditivas, sugeriu-se que anteriormente ao condicionamento auditivo ao medo,

apresentações de sons resultavam em fracas despolarizações dos neurônios do LA e havia nenhuma ou pouca ativação das áreas cerebrais que mediavam a expressão das RCs. No entanto, quando o som e o choque foram pareados no tempo, os neurônios eram fortemente despolarizados resultando na iniciação do processo de “fortalecimento da força sináptica” entre os aferentes auditivos e os neurônios do LA. Após o condicionamento ao medo, as apresentações do som resultavam em despolarização dos neurônios do LA e na ativação de áreas cerebrais que mediavam a expressão das RCs (Blair, 2001).

Este aumento a longo prazo da força sináptica por horas, dias ou talvez até por períodos mais prolongados tem sido chamado de potenciação a longo prazo (do inglês, *long-term potentiation* – LTP) (Pape, 2010), sendo manifestadas no LA após aquisição de relevância do EC (Collins, 2000).

Esta plasticidade sináptica gerada no condicionamento ao medo também ocorre em estruturas aferentes ao LA, como por exemplo o tálamo e o córtex auditivos (Weinberger, 1995; Quirk, 1997).

Assim, sugere-se que o condicionamento ao medo muda a forma como o EC é processado e que esta plasticidade permite que o EC controle a expressão da resposta defensiva após a vivência da experiência aversiva (Collins, 2000).

Outro substrato neural muito importante no condicionamento ao medo é o córtex pré-frontal (CPF), reconhecido como um dos principais substratos modulatórios da resposta comportamental em processos complexos de tomadas de decisão (Bechara, 2000). Ainda, sabe-se que no decorrer de uma tarefa associativa aversiva, o CPF atua inibindo respostas comportamentais que não são mais consideradas relevantes (Morgan,

1995; Morgan, 2003; Quirk, 2003; Milad, 2004; Likhtik, 2005; Moscarello, 2013), possuindo então um papel fundamental para o aprendizado adequado.

1.4.2. CONDICIONAMENTO AO MEDO CONTEXTUAL

O ambiente no qual o condicionamento associativo ocorre pode ser utilizado como um EC poderoso, uma vez que não apresenta uma apresentação física em relação ao ENC (Phillips, 1992, Fanselow, 1980).

Diferentemente de um estímulo discreto, o contexto é formado por uma organização unificada de estímulos estáveis provenientes de modalidades sensoriais múltiplas (Murawski, 2016). Logo, é necessário apenas um tempo mínimo de exposição a este contexto para que estes elementos individuais (cheiro do ambiente, textura do fundo da caixa, cor das paredes da caixa, etc.) se organizem em uma representação única (Bevins, 1995; Fanselow, 1986; Fanselow, 1980).

Estes estímulos multimodais estáveis que formam a representação contextual no momento da ocorrência do ENC serão associados, constituindo o que é chamado de condicionamento contextual (Fanselow, 2010; Rudy, 2004; Rudy, 2009). Entretanto, para que a representação contextual se forme, há uma necessidade de que o animal passe algum tempo explorando o ambiente (Fanselow, 1990). Enquanto uma apresentação simultânea do som e do choque produzem uma resposta condicionada robusta no condicionamento clássico (Mahoney, 1976), um atraso de no mínimo 20 segundos entre a inserção do animal no contexto e o fornecimento do ENC é necessário para que o condicionamento contextual ocorra (Fanselow, 1990). Se o ENC for administrado imediatamente após a inserção do animal na caixa de condicionamento, o medo condicionado não ocorrerá (Fanselow, 1990). Este processo é chamado de “déficit do choque imediato”, uma vez que a representação unificada do contexto não obteve o tempo mínimo necessário para ser formado. Como dito anteriormente, o contexto é formado por vários elementos que

não serão identificados até que o animal inicie a exploração, não havendo então um EC para ser associado ao ENC (Fanselow, 1986; Fanselow, 1990).

Desta forma, o animal deve aprender a tratar o composto complexo de estímulos que formam o contexto como um todo, antes que um estímulo individual seja associado como o EC. Essa associação conjunta dos estímulos provenientes de modalidades sensoriais múltiplas para formar o contexto pode ser chamada de *Gestalt* (Fanselow, 1986).

Se os fatores polimodais do contexto devem ser agrupados para serem interpretados como uma representação única, uma estrutura cerebral que processa estímulos polimodais deve ser recrutada. O hipocampo tem sido apontado como sendo o local no qual essas informações multissensoriais são recebidas, sendo o substrato chave para este tipo de condicionamento associativo (Suzuki, 2004).

Sabe-se que os neurônios hipocampais preferem “responder” em locais específicos e acredita-se que a relação entre os padrões de disparos destes *place neurons* permite aos animais distinguirem os diferentes contextos (Cobar, 2016; Fanselow, 2010).

Place cells (PC) (também chamados de *place neurons*) são neurônios hipocampais que disparam a uma frequência alta quando o animal explora uma região específica do ambiente (O’keefe, 1971). Cada PC possui sua própria região de disparo de preferência, normalmente chamada de *place field* (O’keefe, 1971). As PC foram identificadas em todas as subregiões do hipocampo: áreas CA1 e CA3 (O’Keefe, 1971; Leutgeb, 2004) e giro denteado (Jung, 1993). Vários estudos vem mostrando que a atividade das PC são controladas fortemente pela informação visual que os animais recebem do ambiente circundante (Muller, 1987; O’Keefe, 1987). Entretanto, apesar da informação visual desempenhar um papel crítico, alguns estudos mostraram que as PC são capazes de manter seus padrões de disparos espaciais constantes mesmo no escuro (Quirk, 1990).

Ainda, estudos que utilizavam ratos cegos indicavam a existência de *place fields* na ausência completa da aferência visual (Save, 1998), sugerindo que as PC não dependem somente da informação visual para gerar seus padrões de disparos específicos a localização. Aferências olfatórias (Zhang, 2015) e táteis (Gener, 2013) foram mostradas em também ajudar a determinar a localização dos *place fields*. Dessa forma, a especificidade da localização dos disparos das PC não é determinada por uma modalidade sensorial específica, mas pela integração de tipos múltiplos de informações sensoriais, embora uma modalidade sensorial particular possa ser dominante dependendo da natureza do ambiente circundante (Cobar, 2016).

A representação contextual organizada no hipocampo é então associada ao ENC aversivo no LA, similarmente ao EC discreto do condicionamento clássico (Fanslow, 1994; Fendt, 1999). Esta associação ativa por sua vez o CeA, gerando várias manifestações que constituem as respostas condicionadas de medo (Figura 03). Sabe-se que danos às projeções hipocampo-BLA atenuam o condicionamento contextual, mas não interferem no condicionamento clássico (Philips, 1992; Sutherland, 1990). Entretanto, danos aos neurônios em BLA prejudicam ambos os condicionamentos (clássico e contextual) (Philips, 1992; Fanselow, 2010). Ainda, lesões eletrolíticas no hipocampo dorsal impediram a aquisição e a expressão do medo contextual condicionado (Kim, 1992; Philips, 1992; Maren, 2001).

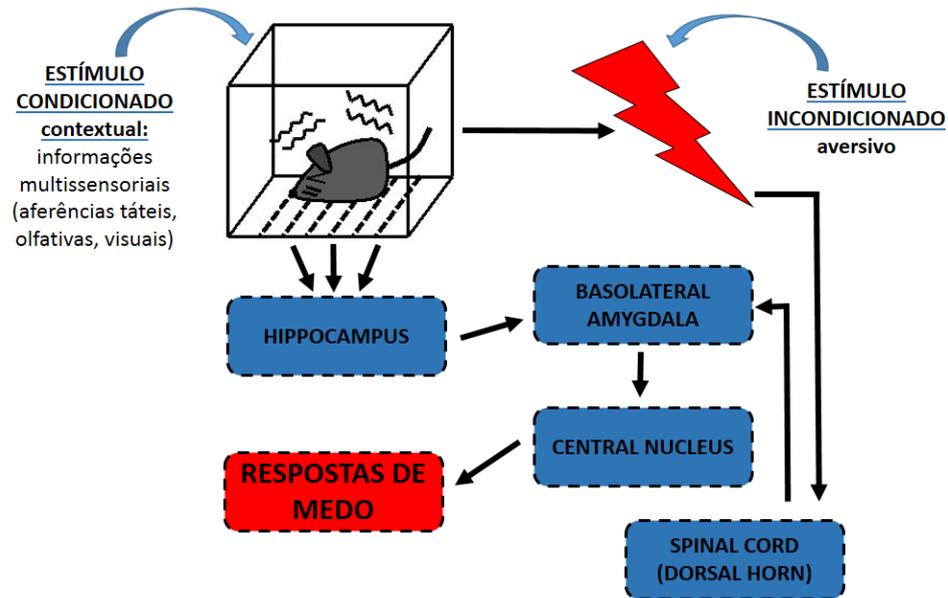


Figura 03: Circuitaria neural envolvida no condicionamento ao medo contextual. A integração da informação sensorial multimodal constituinte do contexto (EC) ocorre no hipocampo, sendo que sua associação ao ENC (choque nas patas) ocorre na amígdala basolateral. A circuitaria descendente proveniente do complexo amigdalóide gera as respostas condicionadas de medo, como por exemplo o congelamento. Figura adaptada de Fanselow, 1994; Fendt, 1999.

1.5. POTENCIAIS EVOCADOS AUDITIVOS

Dentre as técnicas eletrofisiológicas, o registro da atividade bioelétrica gerada por uma população local de neurônios (LFP, do inglês “*Local Field Potential*”), por meio de microeletrodos implantados em porções específicas de circuitos neurais, constitui atualmente o método de escolha para o aumento da resolução espacial de que carecem os registros de escalpo (Leung, 1990). Esta técnica permite a monitoração dos circuitos estudados com alta precisão temporal (microsegundos), representando a atividade de populações neuronais em um raio de 0,5 - 3,0 mm a partir da ponta do eletrodo (Mitzdorf, 1985). É possível também analisar fenômenos oscilatórios gerados pelos grupos de neurônios registrados em bandas de frequência específicas, assim como relações de fase de oscilações geradas em diferentes estágios sinápticos de um circuito neural (Varela, 2001).

Quando essa atividade espontânea de grupos neuronais é perturbada por um estímulo externo, geram-se fenômenos bioelétricos denominados potenciais evocados (Logothetis, 2003; Niedermeyer, 2005). Considerando que o evento externo seja um estímulo acústico, manifestações elétricas de vários núcleos através da via auditiva são evocadas. Isto acontece devido a uma consequência entre a relação que abrange as correntes iônicas sinápticas e os potenciais de ação no período de tempo no qual o estímulo sonoro é propagado através da rede neural. Estas respostas bioelétricas evocadas, que geralmente variam em décimos de microvolts, são chamadas de potenciais evocados auditivos (PEA) (Galambos, 1981; Picton, 2003; Niedermeyer, 2005). Estes podem ser classificados de acordo com a taxa de estimulação na qual são aplicados em:

- 1) Potenciais Evocados Auditivos Transitórios (PEAt) ou
- 2) Potenciais Evocados

Auditivos em Regime Permanente (PEArp) (Picton, 1974; Davis, 1976; Galambos, 1981; Picton, 1987; Regan, 1989).

Nos potenciais evocados auditivos transitórios, os estímulos são apresentados a uma taxa de repetição suficientemente lenta para que cada resposta termine antes da chegada do próximo estímulo, ou seja, os PEAt tem um início e fim bem demarcados. Os estímulos acústicos utilizados neste contexto são de curta duração (em torno de 10 a 50 ms), com intervalos relativamente longos (tipicamente a cada 0,3 – 1,5 segundos). 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 (Dawson, 1947; 1951). 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, 1947; 1951).

Em contrapartida, os PEARp (ASSR, do inglês “*Auditory Steady State Response*”) podem ser obtidos pela apresentação de estímulos a uma taxa alta o suficiente para que o circuito neural envolvido na resposta não retorne ao seu estado basal durante a estimulação (Galambos, 1981; Felix, 2009). *Regan et al.* (Regan, 1989) definiram que um PEARp ocorre quando um estímulo contínuo evoca uma resposta na qual seus constituintes no domínio da frequência (amplitude e fase) se mantêm constantes por períodos de tempo prolongados. Adicionalmente a taxa de estimulação, outra forma de gerar-se uma resposta evocada acústica em regime permanente se dá pela apresentação de tons modulados em amplitude - AM (Picton, 1987). Estes são o resultado da multiplicação de duas ondas senoidais: uma senóide de alta frequência (fp), que é denominada portadora e possui íntima relação com a região da membrana basilar que será

ativada; e uma senóide de baixa frequência (fm), que é denominada moduladora e está correlacionada ao nível de ativação de grupos neuronais recrutados por fp . Obtém-se, desse modo, na rede neural ativada pelo som, uma resposta periódica com frequência de oscilação igual à frequência da moduladora. A análise espectral das respostas bioelétricas geradas por esta rede neuronal durante a estimulação acústica evidencia aumento de energia no valor da frequência de modulação (Kuwada, 1986; Rees, 1986). Em outras palavras, uma assinatura eletrográfica, referente à atividade dos grupos neuronais (próximos ao eletrodo de registro) envolvidos diretamente no processamento do estímulo auditivo, é gerada através das oscilações dos PEArp que se evidenciam especificamente na fm nas análises tempo-frequência. Além disso, os tons AM possuem a vantagem de serem estímulos acústicos espectralmente estreitos, apresentados de forma contínua, durante uma janela temporal maior (Yantis, 1990; Schreij, 2010). As transições na amplitude neste tipo de estímulo são mais suaves, sem alterações abruptas em seu padrão, equiparando-se aos sons contidos na natureza; portanto considerado por alguns pesquisadores como uma forma de estimulação mais fisiológica comparada à estimulação transiente (PEAt são salientes em relação à totalidade do ambiente acústico, de modo que alocam automaticamente a atenção durante sua apresentação) (Yantis, 1990; Schreij, 2010).

Estudos prévios corroboram o argumento de que as respostas evocadas auditivas em regime permanente refletem um fenômeno neural mais complexo do que a simples superposição temporal de respostas transitórias, uma vez que as oscilações na frequência de modulação refletem o balanço da integração sináptica no substrato de interesse, bem como de projeções que também oscilam em fm , sejam elas provenientes de vias ascendentes ou descendentes. Ainda, sabe-se que a capacidade de gerar e manter atividade

oscilatória em diferentes bandas de frequência depende da integridade de circuitos neurais e sistemas neuroquímicos específicos (Brenner, 2009; Krishnan, 2009; Rass, 2012).

Ademais, sabe-se que a escala dos eventos cognitivos está em torno de centenas de milissegundos (Varela, 2001; Florentine, 1988). Dessa forma, a utilização de PEArp tornam-se uma ferramenta ideal para o estudo de fenômenos neurais relacionados a modulação cognitiva, uma vez que possuem uma estabilidade temporal notoriamente maior que os PEAt (cerca de 10-50ms) (Jacobson, 1988).

Com isso justifica-se a ideia de que a ativação da via em regime permanente fornece informações complementares aos estudos prévios de respostas transitórias.

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que as crises epiléticas causam modificações morfológicas e funcionais no tecido neural, o comprometimento cognitivo se desenvolve como um sintoma secundário à epilepsia. Em especial, os danos cognitivos relacionados a memória tem sido um problema comum e incapacitante para os indivíduos com esta doença, sendo amplamente estudados pelos epileptologistas.

Com o intuito de avaliar os prejuízos cognitivos em uma circuitaria epileptogênica, tarefas de condicionamento ao medo vem sendo utilizadas. Neste teste, a memória associativa implícita pode ser avaliada, averiguando se realmente déficits cognitivos podem ser gerados como consequência da hiperexcitação e hipersincronização encontrados nas vias neurais epiléticas.

Vale ressaltar que em tarefas de condicionamento ao medo o complexo amigdalóide (AMY), além de participar ativamente do processo associativo, participa da modulação das respostas emocionais. Essa modulação advém da contínua troca de informações, através da grande densidade de projeções, junto aos substratos límbicos. Ainda, o colículo inferior (CI), principal fonte de projeções para o sistema tálamo-cortical ascendente na via auditiva, é visto como um estágio fundamental no circuitos de processamento de sons, sendo extremamente relevante na investigação dos mecanismos de modificação da sua atividade neural por influências cognitivas.

Dessa forma, torna-se de extrema relevância analisar-se o sincronismo entre essas estruturas cerebrais (AMY e CI) durante os processos de aprendizagem e memória avaliados em uma circuitaria epileptogênica no modelo animal genético WAR. Logo, a tarefa de condicionamento ao medo associativo foi utilizada para responder-se a seguinte

hipótese: “A **facilitação acústico-límbica do rato Wistar audiogênico prejudica o aprendizado associativo auditivo.**”

3. OBJETIVO GERAL

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da modulação cognitiva, relacionados ao aprendizado associativo em uma tarefa de condicionamento ao medo clássico, nos potenciais evocados auditivos em regime permanente (PEArp) no núcleo central do colículo inferior (CI) e no núcleo lateral do complexo amigdalóide (LA) do rato Wistar audiogênico (WAR).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o aprendizado associativo do WAR, no teste de condicionamento ao medo auditivo, através da porcentagem de congelamento;
- Avaliar as alterações na fase e na amplitude dos PEARp observadas no núcleo central do CI em decorrência do aprendizado associativo, no teste de condicionamento ao medo auditivo;
- Avaliar as alterações na fase e na amplitude dos PEARp observadas no LA em decorrência do aprendizado associativo, no teste de condicionamento ao medo auditivo;
- Avaliar o sistema locomotor do WAR através dos testes: Campo aberto, Rotarod e Assimetria bilateral.
- Avaliar a hiperexcitabilidade da via auditiva do WAR através da imunohistoquímica para cFos.

- Avaliar o aprendizado associativo do WAR, utilizando um estímulo condicionado (EC) multimodal, através do condicionamento ao medo contextual.
- Avaliar a memória de reconhecimento do WAR através do teste de reconhecimento de objeto novo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DIRETRIZES ÉTICAS

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFG) sob o número de processo 264/2015. As diretrizes do CEUA-UFG estão de acordo com as recomendações do Conselho nacional de controle de experimentação animal (CONCEA), da Sociedade Brasileira de Neurociências e da *'Behavior Guidelines for Animal Experimentation'* para manejo e uso de animais em experimentos.

4.2. SUJEITOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados neste trabalho 82 ratos albinos machos da linhagem Wistar e 67 ratos machos da linhagem WAR com peso entre 270 e 310 gramas (aproximadamente 08 semanas de idade). 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 $22^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Para que os animais fossem incluídos nos protocolos experimentais, estes deveriam se adequar ao seguinte critério de inclusão:

- **Determinação da sensibilidade frente ao estímulo acústico:** Todos os animais foram submetidos a três estimulações acústicas (110dB) com intervalo inter-estímulo de 48 horas. A estimulação audiogênica foi aplicada por um período de 60 segundos (ou até a crise epilética ocorrer), no qual o comportamento do animal era avaliado a partir da escala Garcia-Cairasco (1996), a qual quantificaria o índice de severidade do animal à crise audiogênica.

No grupo experimental, o critério de inclusão foi determinado pela apresentação de no mínimo duas convulsões com índice de severidade igual ou superior a 0.85.

Já no grupo controle, este índice deveria ser igual a 0,0, ou seja, o animal deveria ser totalmente resistente à crise audiogênica.

Este procedimento descrito acima é conhecido como *Screening* Audiogênico.

4.3. MANUTENÇÃO DA COLÔNIA WAR

A manutenção da colônia WAR é realizada pelos alunos do NNC que utilizam os animais, sendo realizada como descrição a seguir. São mantidas no biotério as matrizes (fêmeas e machos) com índice de gravidade superior ou igual a 0.85, de acordo com a escala Garcia-Cairasco (1996). A idade máxima das matrizes é de 180 dias. Após este período, os animais são sacrificados.

O acasalamento dos animais era realizado entre casais de uma mesma ninhada (filhotes da mesma fêmea), priorizando o número máximo de 04 animais por caixa: 01 macho e 03 fêmeas. Durante o acasalamento, as matrizes eram mantidas na mesma caixa por um período de 15 dias. Logo após, cada fêmea era realocada para uma caixa individual e os machos eram reagrupados, aguardando para um próximo cruzamento.

Após o período de separação, as fêmeas eram observadas por 21 dias, período médio de duração de sua gestação. Após o nascimento, os filhotes eram mantidos com suas mães por um período de 21 dias alimentando-se por meio da amamentação. Finalizando este período, os filhotes eram desmamados e separados em caixas distintas: fêmeas em uma caixa e machos em outra caixa. As mães, no dia do desmame, eram então reagrupadas para aguardar o próximo cruzamento.

Os animais filhotes, após o desmame, eram alimentados por ração e observados diariamente até o 70º dia após o nascimento, período denominado crescimento. No 70º dia ocorria a triagem audiogênica dos animais, protocolo no qual a seleção dos roedores era feita por meio de seus índices de gravidade Garcia-Cairasco, utilizando-se uma estimulação sonora de 110dB.

A cada *Screening audiogênico* o macho e a fêmea com maior IG (≥ 0.85) eram identificados como matrizes. O restante dos animais eram distribuídos para os pesquisadores de acordo com a demanda do laboratório.

4.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais utilizados neste trabalho foram divididos em cinco grupos, sendo eles:

Grupo 01: Protocolo de estimulação sonora seguida por análise de imunohistoquímica: 10 ratos Wistar e 11 ratos WAR machos foram submetidos à um protocolo de estimulação sonora de baixa intensidade (85dB). Baseando-se no fato de que o WAR manifesta uma crise epilética reflexa induzida por estímulo sonoro de alta intensidade (110dB), decidimos selecionar dois substratos pertencentes a via auditiva para avaliarmos a ativação neuronal, mediada pela marcação de proteínas c-Fos.

Grupo 02: Protocolo de condicionamento ao medo auditivo: 36 ratos Wistar e 23 ratos WAR foram utilizados para avaliar o aprendizado aversivo associativo, utilizando-se o EC unimodal (som).

Grupo 03: Protocolos comportamentais controle – avaliação atividade locomotora: 10 ratos Wistar e 07 ratos WAR machos foram utilizados para realizarem três testes comportamentais: Campo aberto, Assimetria bilateral e Rotarod. Estes três testes comportamentais foram realizados a fim de analisar a locomoção espontânea, déficit sensorio-motor e coordenação motora, a fim de descartar-se a possibilidade de comprometimento motor no WAR.

Grupo 04: Protocolo de condicionamento ao medo contextual: 16 ratos Wistar e 18 ratos WAR foram utilizados para avaliar o aprendizado aversivo associativo, utilizando-se o EC multimodal (contexto).

Grupo 05: Protocolo de reconhecimento de objeto novo: 10 ratos Wistar e 08 ratos WAR foram utilizados para avaliar a memória de reconhecimento.

*Todos os protocolos citados acima serão descritos na seção “**Protocolos experimentais**”.*

4.5. ESTIMULAÇÃO SONORA UTILIZANDO RESPOSTAS EVOCADAS EM REGIME PERMANENTE

A estimulação sonora utilizada no “**Protocolo de estimulação sonora seguida por análise de imunohistoquímica**” e “**Protocolo de condicionamento ao medo auditivo**” foi gerada através de um conversor digital-analógico (placa de *Arduino Due*), cujo sinal analógico de saída é determinado por um algoritmo computacional, de forma a se produzir tons puros possivelmente modulados em amplitude.

Para que os potenciais evocados auditivos em regime permanente (PEArp) fossem gerados, os estímulos sonoros foram constituídos por um tom senoidal puro de **10.000 Hz** (frequência portadora, f_p) modulado em **53,71 Hz** (frequência moduladora, f_m), a uma profundidade de 100%, utilizando uma frequência de amostragem de 20.000Hz. Em ambos os protocolos o estímulo sonoro era calibrado em 85dB, intensidade incapaz de induzir a CA no WAR.

4.6. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.6.1. GRUPO 01: PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO SONORA SEGUIDA POR ANÁLISE DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Já havia sido mostrado na literatura que o WAR apresenta uma hiperexcitação no CI (Pinto, 2017). Desta forma, realizamos este protocolo com o intuito de verificar se este aumento de energia nas respostas evocadas do CI do WAR era consequente a um aumento de energia nas respostas dos neurônios registrados ou um maior recrutamento de neurônios para processamento do estímulo sonoro.

4.6.1.1. Protocolo de estimulação sonora

Para que este protocolo fosse realizado, os animais utilizados foram primeiramente divididos em dois grupos experimentais: grupo com estimulação sonora (SOM_{on}) e grupo sem estimulação sonora (SOM_{off}), como mostrado na tabela abaixo:

GRUPOS	WISTAR	WAR	TOTAL
<i>Com estimulação sonora (SOM_{on})</i>	05	05	10
<i>Sem estimulação sonora (SOM_{off})</i>	05	06	11

Tabela 01: Animais utilizados no “Protocolo de estimulação sonora seguida por análise de imunohistoquímica.

Os animais que faziam parte do grupo **SOM_{on}** eram submetidos ao estímulo acústico por 60s, acompanhado por dois períodos de silêncio (30s cada; antes e após o estímulo auditivo), totalizando uma duração de 120s.

Em contrapartida, os animais que faziam parte do grupo **SOM_{off}** eram somente expostos a caixa de estimulação sonora, porém, sem a reprodução do estímulo sonoro (silêncio), também por um período de 120s.

Ao final da realização do protocolo, todos os animais eram sacrificados e perfundidos após 90min, objetivando o tempo de maior expressão proteica (Worley, 1993; Knapska, 2009).

4.6.1.2. Protocolo de imunohistoquímica para cFOS

Os animais foram anestesiados (Uretana 14%, 10 ml/Kg) e submetidos a perfusão cardíaca com tampão fosfato salina (PBS) seguido por paraformaldeído (PFA) 4%. Os cérebros foram removidos, fixados em PFA 4% e mantidos a 4°C. Após 24h, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose a 30% e mantidos à 4°C por 3 dias.

Todos os 21 cérebros foram congelados em isopentano 99% a -45°C e seccionados (Cryostat 300 e ANCAP Ltd) a 40µm de espessura. As fatias do CI foram quantificadas em uma secção sagital em uma coordenada médio-lateral fixa de -1.9mm (referenciada à sutura medial). Já as fatias do lobo temporal auditivo (LTA) foram quantificadas utilizando-se secções coronais a uma coordenada fixa antero-posterior de -3.5 mm (referenciada ao bregma). Todas as fatias cerebrais seccionadas foram estocadas à -20°C em solução crioprotetora (PBS, sacarose à 20%, etilenoglicol à 15%, NaN₃ à 0.05%) e processadas simultaneamente no protocolo de imunohistoquímica para evitar viés.

Em seguida, as secções foram lavadas três vezes por 6 min (3 x 6 min) em TBS antes de serem inseridas em peróxido de hidrogênio 3% (3% H₂O₂/TBS) por 10 min. Posteriormente, as secções foram lavadas 3 x 6 min em TBS seguido por 2h de incubação em solução bloqueadora [3% *normal goat serum* (NGS) in TBS/0.3% Triton X-100]. O anticorpo primário imunorreativo para c-Fos (Santa Cruz, sc-52) com diluição 1:1000, foi incluído e incubado overnight à temperatura ambiente.

No dia seguinte, as secções foram lavadas 3 x 6 min em TBS com Triton X-100 0.3% e incubadas com o anticorpo secundário (1:1000, biotinylated anti-IgG antibody goat antirabbit; Vector Laboratories) por 2 h à temperatura ambiente. Após, as secções foram lavadas 3 x 6 min em TBS com Triton X-100 0.3% e incubadas com o complexo biotina avidina (AB) (1:500 in TBS with 0.3% Triton X-100; Vector Laboratories)

durante 1h à temperatura ambiente. Logo em seguida as secções foram lavadas 3 x 6 min em TBS e 3 x 6 min em acetato 174 mM. As secções foram cobertas por uma solução contendo Diaminobenzidina (DAB) 0.2 mg/ml, sulfato de níquel à 25 mg/ml e acetato à 0.0025% H₂O₂ por 15 min.

Finalmente, as secções foram lavadas 3 x 6 min em acetato 174 mM e montadas em laminas gelatinizadas, secas ao ar livre, desidratadas com xilol e cobertas por Entellan (Fonseca, 2013).

4.6.1.3. Análise de imunohistoquímica para cFOS

Após realizado o protocolo de imunohistoquímica para cFOS, fotografias das secções cerebrais foram tiradas utilizando-se a câmera digital AxioCam MRm (Zeiss) com o auxílio do programa Carl Zeiss Axiovision 4.8 (imagens 1388 x 1040 pixels; 0.5123 μ m x 0.5123 μ m pixel size). Logo em seguida, as fotografias salvas no formato ZVI foram analisadas utilizando-se o programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A técnica de limiar automático do ImageJ foi utilizado para construção de uma máscara que separava as células marcadas do background. Nesta técnica o mesmo nível de limiar para os pixels era estabelecido, sendo que as células marcadas apresentavam-se ~60% mais escuras que o background, mantendo esse padrão para todas as imagens analisadas.

Um objeto identificado somente era quantificado como célula se seu tamanho (micrometros²) era definido entre 25-100 com circularidade entre 0.00 – 0.80. Com o intuito de elevar-se a resolução espacial das imagens adquiridas, cada fatia com sua referida estrutura alvo foi reconstruída a partir de um mosaico formado por 50-60 fotos individuais e sequenciais com sobreposição ~40%, utilizando-se a objetiva de 5x do microscópio Zeiss system. Axio Imager.M2 (1388x1040 pixels cada).

As regiões de interesse (ROI) selecionadas, CI e LTA, foram quantificadas em sua totalidade em uma única fatia por animal, respeitando uma particular coordenada anteroposterior (-3.5 mm Bergma) coronalmente para o LTA e à uma particular coordenada mediolateral (-1.9 mm sutura medial) sagitalmente para o CI. A coordenada especifica para cada fatia foi escolhida, ao invés de uma varredura rostrocaudal (secções coronais) ou mediolateral (secções sagitais), com o intuito de avaliar-se todos os animais em uma mesma secção para as áreas alvo. Toda a quantificação foi realizada dentro das

ROIs, como demonstrado no diagrama esquemático do Atlas cerebral de roedores mostrada na Figura 06. Com o intuito de fornecer comparações inter-ROIs, o número total de células marcadas foi normalizado pela área de cada ROI em mm².

Além disso, nenhuma diferença estatística foi observada para a área total analisada entre as fatias entre os grupos de animais e/ou condições. Em outras palavras, o tamanho das áreas das ROIs não diferiram entre os animais intra-grupo ou intergrupo.

4.6.2. GRUPO 02: PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO AUDITIVO

O teste comportamental descrito a seguir foi realizado para analisar-se o aprendizado aversivo associativo do WAR, utilizando-se um EC unimodal (som).

Para que este experimento fosse realizado, utilizaram-se 36 ratos Wistar e 23 ratos WAR. Os animais foram distribuídos randomicamente entre os grupos NÃO PAREADO e PAREADO, como detalhado na tabela abaixo:

GRUPOS	WISTAR	WAR	TOTAL
Não pareado	17	12	29
Pareado	19	11	30

Tabela 02: Animais utilizados no “Protocolo de condicionamento ao medo auditivo”.

4.6.2.1. Cirurgia para implantação de eletrodos profundos

Somente os animais que foram submetidos ao protocolo de condicionamento ao medo auditivo foram passaram pelo procedimento cirúrgico. Os 59 animais foram anestesiados com uma solução de quetamina (30mg/kg) e xilazina (5mg/kg), de acordo com as recomendações do comitê de ética no uso de animais da UFMG (CEUA-UFMG). Se necessário, era fornecido ao animal um reforço anestésico de 0,1 mL de quetamina (10g/100 mL) intraperitonealmente.

Após a indução anestésica, período no qual o animal apresenta-se totalmente anestesiado, a região superior da cabeça era tricotomizada. Logo em seguida, o animal era posicionado em aparelho estereotáxico (Stoelting Co.) e fixado por meio de barras auriculares maciças. Após a fixação, era realizado degermação da parte superior da cabeça do animal, realizando-se em seguida 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. Era então realizada a limpeza da região da excisão, retirando-se todo o sangue e tecido subcutâneo inseridos na região de interesse com o auxílio de salina estéril, com o intuito de expor o crânio e suas suturas de interesse.

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 esquerda e referência à direita) e no osso parietal à esquerda (não conectado, somente utilizado para maior fixação do conector). Realizou-se em seguida, mais duas trepanações nas coordenadas *AP: -9,0 mm, LL: -1,4 mm, DV: -4,0 mm (CI)* e *AP: -2,8 mm, LL: -5,0 mm, DV: -7,2 mm (LA)*, utilizando-se o bregma como referencial (Paxinos e Watson, 1998) para implantação dos eletrodos de registro. Estes eram fixados do lado direito do crânio com o auxílio da substância cimento de zinco. Os quatro eletrodos (terra, referência e ativos) eram então

soldados ao conector RJ-11 de 6 pinos, cobrindo-se logo em seguida a ferida cirúrgica com acrílico odontológico (Figura 04).

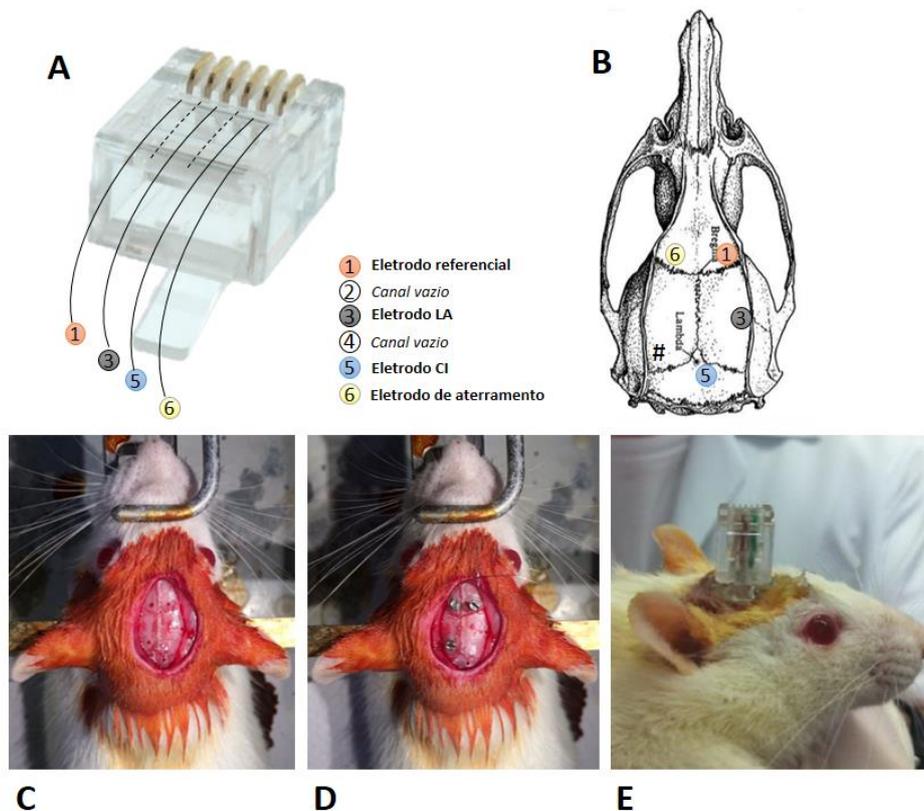


Figura 04: Cirurgia estereotáxica para implantes de eletrodos profundos. A. RJ11 de 6 pinos e suas conexões: 1: Eletrodo referencial; 3: Eletrodo do LA; 5: Eletrodo do CI; 6: Eletrodo de aterramento; 2 e 4: canais vazios utilizados somente para fornecer mais estabilidade ao conector (não eram ligados a nenhum contato). B. Locais nos quais os eletrodos e parafusos eram fixados no crânio dos roedores. #: local no qual o parafuso de suporte era fixado. C. Trepanações feitas para inserção dos eletrodos e parafuso de suporte. D. Parafusos fixados no crânio dos animais. E. Cirurgia finalizada e conector RJ11 de 6 pinos fixado no crânio do rato. Adaptado de Paxinos e Watson, 1998.

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 eram mantidos na manta térmica até que se recuperassem da indução anestésica, quando eram então transferidos para gaiolas individuais. Após 7 dias de recuperação os animais eram submetidos ao protocolo de condicionamento ao medo.

4.6.2.2. Paradigma de condicionamento ao medo auditivo

O protocolo de condicionamento ao medo auditivo utilizado neste trabalho utilizou dois tipos de estímulos: o estímulo condicionado (EC) e o estímulo não condicionado (ENC). O EC foi descrito previamente na sessão “ESTIMULAÇÃO SONORA UTILIZANDO RESPOSTAS EVOCADAS EM REGIME PERMANENTE”, ao passo que o ENC foi composto por uma corrente elétrica de 0,4 mA aplicada por 2s nas patas dos animais através de barras de metal no chão da caixa de condicionamento.

Este protocolo foi desenvolvido durante um período de três dias consecutivos, utilizando-se dois grupos: grupo pareado e grupo não pareado.

No grupo pareado, o primeiro dia de estimulação sonora (pré-treino) era composto por uma apresentação de uma seqüência de 5 EC (intervalo inter-estímulos pseudo-randomizado, 30 a 180 s) no contexto A (uma caixa de acrílico preto de 30 x 20 x 25 cm).

Já no segundo dia de experimentação (treino), os animais eram colocados no contexto B (caixa de condicionamento de 23 x 23 x 23), sendo que cada apresentação dos 5 EC era dessa vez, pareada à aplicação de um ENC durante os 2 últimos segundos de apresentação do som.

Por fim, no último dia de experimentação (terceiro dia - teste), os animais eram novamente expostos apenas às 5 apresentações do EC no contexto A, sem a apresentação do ENC.

No grupo não pareado o mesmo protocolo foi desenvolvido ao longo dos três dias. Entretanto, no dia do treino (segundo dia de experimentação) o ENC era fornecido durante os períodos de silêncio, e não durante os 2 últimos segundos do EC. O intuito da modificação temporal do fornecimento do estímulo incondicionado era o de não realizar a associação entre os EC-ENC.

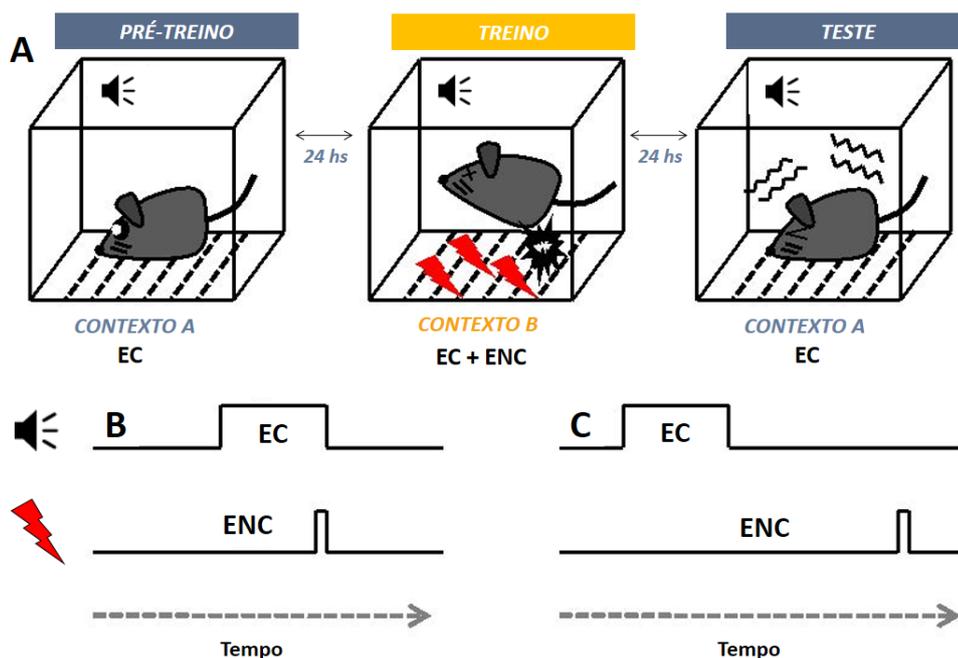


Figura 05: Desenho esquemático do protocolo de condicionamento ao medo auditivo. A. No primeiro dia (pré-treino - PT) o roedor é inserido no contexto A e o EC é fornecido. No dia seguinte (treino - T) o roedor é inserido no contexto B e o EC é pareado ao ENC no grupo pareado. No grupo não pareado o EC é fornecido de forma não pareada ao ENC, ou seja, em momentos distintos. No terceiro dia (teste - TT) o animal é reexposto ao contexto A e somente o EC é fornecido. Quantifica-se então a resposta de medo condicionada. **B.** Padrão de temporização do EC e ENC no grupo pareado no dia do T. **C.** Padrão de temporização do EC e ENC no grupo não pareado no dia do T.

O aprendizado da tarefa foi mensurada através da manifestação de uma das respostas de medo descritas na literatura no dia do teste: a resposta defensiva de congelamento (*freezing*). Este comportamento foi definido como a ausência total de movimentos, exceto os respiratórios, sendo numericamente expresso como a porcentagem de tempo durante a qual o animal se manteve nesta condição durante a apresentação do EC.

A quantificação foi feita posteriormente através das análises realizadas nas vídeo-gravações por um experimentador cego. Os 30 segundos da apresentação de cada EC foram divididos em 6 janelas de 5 segundos. Caso o animal permanecesse congelado por

3 segundos contínuos dentro de uma mesma janela, esta seria contabilizada como uma janela positiva para congelamento.

Vale a pena mencionar que a caixa de condicionamento utilizada neste trabalho foi idealizada e construída pelos alunos do Núcleo de Neurociências, gerando como consequência o trabalho de mestrado do aluno Paulo Aparecido Amaral Junior, pesquisador que tomou frente da programação deste *setup*. Se for de interesse, a dissertação do aluno está disponível para maiores informações.

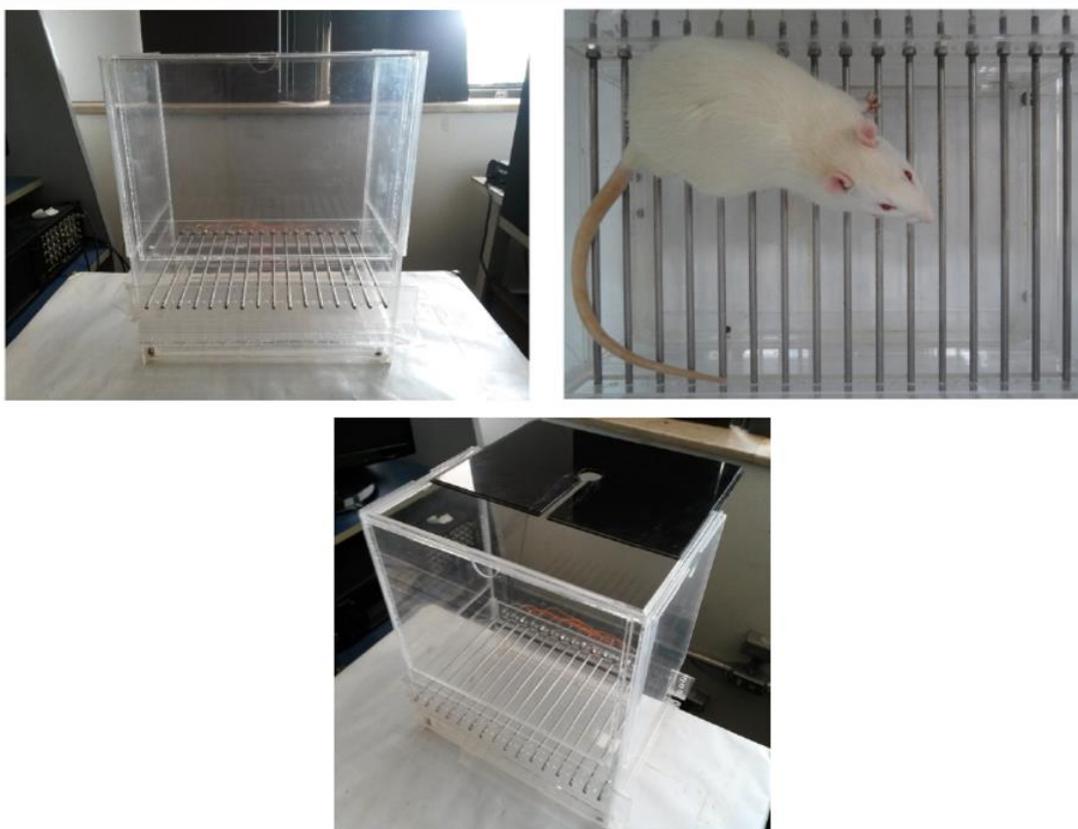


Figura 06: Caixa de condicionamento criada no Núcleo de Neurociências. Caixa de acrílico transparente com barras cilíndricas de aço inox eletrificadas formando o piso.

4.6.2.3. Registros eletrofisiológicos

Os registros eletrofisiológicos foram obtidos através de um estágio pré-amplificado de ganho unitário (ganho 1x, adaptador ZCA-AMN16, Omnetics[®]) acoplado a um fino cabo que se conectava ao RJ11 de 6 vias (ZC16 – 16 canais ZIF CLIP, Omnetics[®] acoplado ao RJ11). Os potenciais de campo local (LFP) foram registrados e filtrados (1 a 2000Hz) pelo condicionador analógico de sinais (Tucker-Davis Technologies PZ2) acoplado em uma estação de trabalho (DELL Precison T3400) onde está instalado o programa de aquisição (RpvdsEx, Tucker-Davis Technologies).

Após o processamento analógico, os sinais foram digitalizados a uma taxa de amostragem de 12 kHz. O primeiro canal de registro foi dedicado a uma onda senoidal com a mesma frequência e fase da moduladora, sendo utilizado como referência para o cálculo da fase do LFP. Outros 2 canais foram dedicados à aquisição dos LFPs do AMY e do CI.

Todos os experimentos foram registrados através de gravações de vídeo (TVnPC P6), para que posteriormente fossem utilizadas para realizar comparações entre os achados eletrofisiológicos e comportamentais. Os dados adquiridos foram exportados para o programa Matlab[®], no qual os resultados foram analisados através de rotinas desenvolvidas em nosso próprio laboratório.

4.6.2.4. Processamento digital dos sinais

A análise tempo-frequência dos sinais de LFP registrados foi feita através de *software* escrito em MATLAB® R2013a, 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. Esta janela deslizante permite a caracterização de variações de amplitude e fase do LFP ao longo do tempo.

Para o cálculo da STFT utilizaram-se janelas Hanning não sobrepostas contendo 32.768 pontos (2,6844 segundos) da série temporal. 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.

Para todas as análises subsequentes dos PEArp a amplitude basal A_b foi calculada para cada animal como sendo a média da amplitude em f_m para todas as n janelas espectrais do pré-estímulo. As amplitudes normalizadas A_{norm} dos PEArp de cada animal, para todas as n janelas espectrais durante os protocolos de estimulação sonora foram expressas como porcentagem em relação à amplitude basal. Os resultados que representam um único valor de amplitude para cada período de tempo durante a estimulação sonora foram obtidos realizando-se a média das A_{norm} de todas as janelas espectrais referentes àquele período de tempo.

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

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

O PLV foi calculado para as mesmas janelas usadas para o cálculo dos valores de amplitude, obtendo-se da mesma forma um único valor para cada apresentação do EC, que é um número real variando entre zero e um, em que PLV=0 significa uma distribuição uniforme dos N valores de fase e PLV = 1 significa uma perfeita sincronização de fase em torno de um valor θ específico.

4.6.2.5. Análise histológica: posicionamento dos eletrodos profundos

Todos os animais submetidos aos registros eletrofisiológicos no paradigma de condicionamento ao medo auditivo, após verificação histológica, deveriam apresentar os eletrodos de registro corretamente posicionados no CI e no LA. Somente os animais que continham os eletrodos nestes núcleos específicos foram incluídos nas análises eletrofisiológicas.

Para que a verificação do posicionamento dos eletrodos ocorresse, os animais foram primeiramente anestesiados com uma solução de uretana (14% p/v; 10 ml/kg). Após completa indução anestésica, foi fornecido uma corrente elétrica de 2mA por uma duração de 2s em nos eletrodos ativos de cada animal. Esta corrente elétrica gera uma lesão eletrolítica no tecido cerebral, sendo possível identificar o local exato que os eletrodos estavam posicionados. Logo após, os animais eram submetidos ao protocolo de perfusão cardíaca, na qual era infundido uma solução tampão fosfato salina (PBS), seguido por solução de paraformaldeído solubilizado em PBS (PFA4%) através da artéria aorta do roedor.

Após perfusão, os cérebros foram removidos, pós fixados em PFA 4% p/v e mantidos a 4 °C por 24 hs. Em seguida, os cérebros foram transferidos para solução de sacarose solubilizada em PBS (30% p/v) e mantidos a 4° C por 72 hs. Finalmente, os cérebros foram congelados em Isopentano (99%) e estocados a -80°C.

A partir de cortes coronais (AMY) e sagitais (CI) realizados a 40 µm (Micrótomo de Congelação, LUPE Indústria e Comércio / MC-00), algumas fatias, de acordo com as coordenadas estereotáxicas referentes ao implante dos eletrodos ativos, foram selecionadas e coradas para confirmação do implante de eletrodo, seguindo protocolo de

marcação com solução de vermelho neutro [Vermelho neutro (1% p/v); acetato de sódio anidro (0,3% p/v); ácido acético glacial (0,12% v/v)].

4.6.3. GRUPO 03: PROTOCOLOS COMPORTAMENTAIS CONTROLE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Os três testes comportamentais descritos a seguir foram realizados para analisar-se o déficit sensório-motor, locomoção espontânea e a coordenação motora nos animais, a fim de descartar-se a possibilidade de comprometimento motor no WAR.

4.6.3.1. Teste de Assimetria bilateral (*Asimmetry Bilateral Test*)

Neste teste comportamental tiras de fita crepe (1 x 5 cm) foram coladas, randomicamente, em cada pata dianteira dos animais. Em seguida, os roedores eram colocados em uma caixa de acrílico transparente, sendo realizadas vídeo-gravações (câmera Microsoft®) para posterior quantificação (off-line) da latência para a remoção da fita crepe.

Foram realizados 4 *trials* do experimento, sendo que cada *trial* era composto por 03 minutos de duração (Veizovic, 2001).

4.6.3.2. Teste de Campo aberto (*Open field Test*)

Neste teste comportamental a atividade locomotora dos animais foi mensurada utilizando-se um aparato de campo aberto (caixa de madeira [60 cm × 60 cm]) com 40 cm de altura.

Os roedores eram colocados no centro da arena do campo aberto e a distância percorrida pelo animal era quantificada através do *software* ANY-Maze (version 4.5, Stoelting). Este programa detecta a posição do animal na arena do campo aberto e calcula a distância percorrida por ele (Almeida-Santos, 2013).

Os experimentos possuíam a duração de 5min, sendo também registrados por vídeo-gravações através de uma câmera (Microsoft®) localizada sobre (dois metros acima) o aparato de campo aberto.

4.6.3.3. Teste Rotarod (*Rotarod Test*)

O teste do Rotarod foi utilizado para avaliar o equilíbrio e a coordenação motora dos animais experimentais. O equipamento Rotarod utilizado no presente estudo é um aparelho composto por um cilindro giratório de 5 cm de diâmetro e 28 cm de comprimento posicionado horizontalmente a 40 cm de altura. O cilindro giratório está conectado a um motor elétrico que funciona em diferentes velocidades.

Na sessão de treinamento, os animais eram colocados na plataforma giratória a uma velocidade de 5rpm. O treinamento tinha duração máxima de 180s, sendo que a média do número de quedas e a latência para a primeira queda eram contabilizadas.

Já na sessão do teste, realizado 24 horas após o dia de treinamento, a velocidade constante do aparelho foi ajustada para 25 rpm, submetendo-se o animal à três *trials* com intervalos de 30 minutos. Registrava-se então, o número de quedas e a latência para a primeira queda em cada *trial*, contabilizando a média final destes valores para realizar-se as análises estatísticas.

Durante o treino e o teste, se o animal caísse, o mesmo era reconduzido à barra giratória pelo experimentador até esgotar-se o tempo de 180s. (Sharma, 2016).

4.6.4. **GRUPO 04:** PROTOCOLO DE CONDICIONAMENTO AO MEDO CONTEXTUAL

O teste comportamental descrito a seguir foi realizado para analisar-se o aprendizado aversivo associativo do WAR, utilizando-se desta vez, um EC multimodal (contexto).

Para que este experimento fosse realizado, utilizaram-se 16 ratos Wistar e 18 ratos Wistar audiogênicos. Os animais foram distribuídos randomicamente entre os grupos CONTROLE e EXPERIMENTAL, como detalhado na tabela abaixo:

GRUPOS	WISTAR	WAR	TOTAL
Controle	07	07	14
Experimental	09	11	20

Tabela 03: Animais utilizados no “Protocolo de condicionamento ao medo contextual”.

O paradigma de condicionamento ao medo contextual ocorreu durante dois dias, com um intervalo de 24 horas entre o treino e o teste. No primeiro dia (treino), os animais do grupo EXPERIMENTAL foram expostos a caixa de condicionamento passando pelo seguinte protocolo: 03 minutos de exploração seguido por 03 choques nas patas (ENC: 0.4mA; duração: 2s) com 02 minutos de intervalo entre os choques. Após o fornecimento do último ENC, foi fornecido um intervalo de 01 minuto, totalizando um tempo total de 08 minutos de experimentação. Os animais do grupo CONTROLE, no entanto, foram somente expostos a caixa de condicionamento por um período de 08 minutos, não sendo fornecido ENC aos animais, ocorrendo somente a exploração contextual.

No dia do teste (24 horas após a realização do treino), todos os animais de ambos os grupos foram expostos a caixa de condicionamento por 02 minutos, sendo quantificado o comportamento de congelamento a este contexto (Soler-Cedeno, 2016).

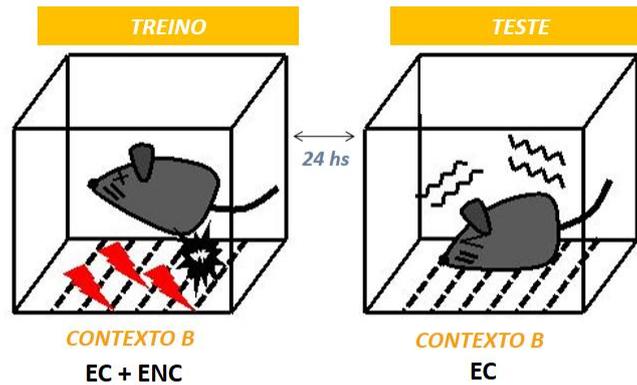


Figura 07: Desenho esquemático do protocolo de condicionamento ao medo contextual. A. No primeiro dia (treino - T) o roedor é inserido no contexto B e o ENC é fornecido. No dia seguinte (teste - TT) o roedor é reexposto ao contexto B sem a apresentação do ENC. Quantifica-se então a resposta de medo condicionada.

4.6.5. **GRUPO 05:** PROTOCOLO DE RECONHECIMENTO DE OBJETO NOVO

O teste comportamental descrito a seguir foi realizado para analisar-se a memória de reconhecimento de objeto do WAR. Estudos neuroetológicos mostraram que as crises epiléticas podem gerar alterações comportamentais consequentes de danos neurológicos mediados pelas convulsões (Lopim, 2016; Bertti, 2014; Jokeit, 2001; Malheiros, 2012). Dessa forma, decidimos realizar este teste para avaliarmos se a memória de reconhecimento de objeto do WAR está alterada.

Para que este experimento fosse realizado, utilizaram-se 10 ratos Wistar e 08 ratos Wistar audiogênicos, como detalhado na tabela abaixo:

GRUPO	WISTAR	WAR	TOTAL
Memória de longa duração	10	08	18

Tabela 04: Animais utilizados no “Protocolo de reconhecimento de objeto novo”.

No primeiro dia (habituação), os animais foram expostos a uma caixa plástica vazia (50cm x 40cm x 20cm) por um período de 10 minutos. Vinte e quatro horas após a sessão de habituação, os animais foram expostos a mais 01 minuto de reabilitação, seguida pela sessão de treino, na qual eram ofertados aos animais dois objetos idênticos para exploração, por um período de 10 minutos. Os dois objetos eram sempre colocados na mesma posição dentro da caixa. A retenção da memória foi avaliada durante a sessão

de teste, realizada 24hs após a sessão do treino. Nela, o objeto familiar e o objeto novo eram apresentados aos animais exatamente na mesma posição que os objetos foram apresentados no dia do treino, também por uma duração de 10 minutos.

Entretanto, durante o teste, para evitar-se uma preferência natural dos animais pela localização dos objetos, os mesmos eram pseudo-randomicamente trocados de lado. Ou seja, no teste de um animal o objeto novo permanecia do lado esquerdo da caixa e no seguinte animal, o objeto novo permanecia do lado direito da caixa (Fonseca, 2013).

Entre cada troca de animal, a caixa e os objetos explorados eram limpos com álcool 70%. O tempo de exploração foi definido como “cheirar” ou “tocar” o objeto com o nariz. Os dados foram expressos como o índice de reconhecimento de objeto (IR), calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IR = \frac{TEON}{TEON + TEOF}$$

TEON: *Tempo de exploração do objeto novo*

TEOF: *Tempo de exploração do objeto familiar*

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram apresentados como médias \pm S.E.M. Anteriormente à realização dos testes estatísticos, todos os dados foram submetidos às análises de normalidade através do teste de Kolmogorov- Smirnov. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste RM-ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni em acórdância com o coeficiente de variação. Quando apenas duas variáveis eram comparadas, as análises foram realizadas através do Teste T.

Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados utilizando-se o Software GraphPad Prism 6.0.

5. RESULTADOS

Os resultados demonstraram distintos padrões eletroencefalográficos e imunohistoquímicos para os grupos analisados, sugerindo haver uma hiperexcitabilidade na via neuronal avaliada no WAR.

O número de células marcadas pela ativação neuronal mediada pelo c-FOS apresentou um aumento estatístico no CI (SOM_{on}: Wistar n=5; WAR n=5 / SOM_{off}: Wistar n=5, WAR n=6; $F_{1, 17} = 3.09$; $p=0.0212$) e no LTA (SOM_{on}: Wistar n=4; WAR n=4 / SOM_{off}: Wistar n=4; WAR n=6; $F_{1, 14} = 4.033$; $p = 0.0201$), durante o período de estimulação sonora (85dB) no grupo WAR (Figura 08). Nas análises intra-grupo também houve um aumento significativo na ativação neuronal pelo estímulo externo sonoro no CI ($F_{1, 17} = 3.09$; $p=0.0025$) e no LTA ($F_{1, 14} = 4.033$; $p = 0.0012$) somente no grupo WAR (Figura 08).

Uma vez comprovado que o WAR possui uma hiperexcitabilidade em sua via auditiva, realizamos então os testes comportamentais controle, com o intuito de avaliarmos a atividade motora destes animais. O objetivo era o de excluir qualquer comprometimento motor que poderia prejudicar o desempenho dos animais na tarefa de condicionamento ao medo auditivo.

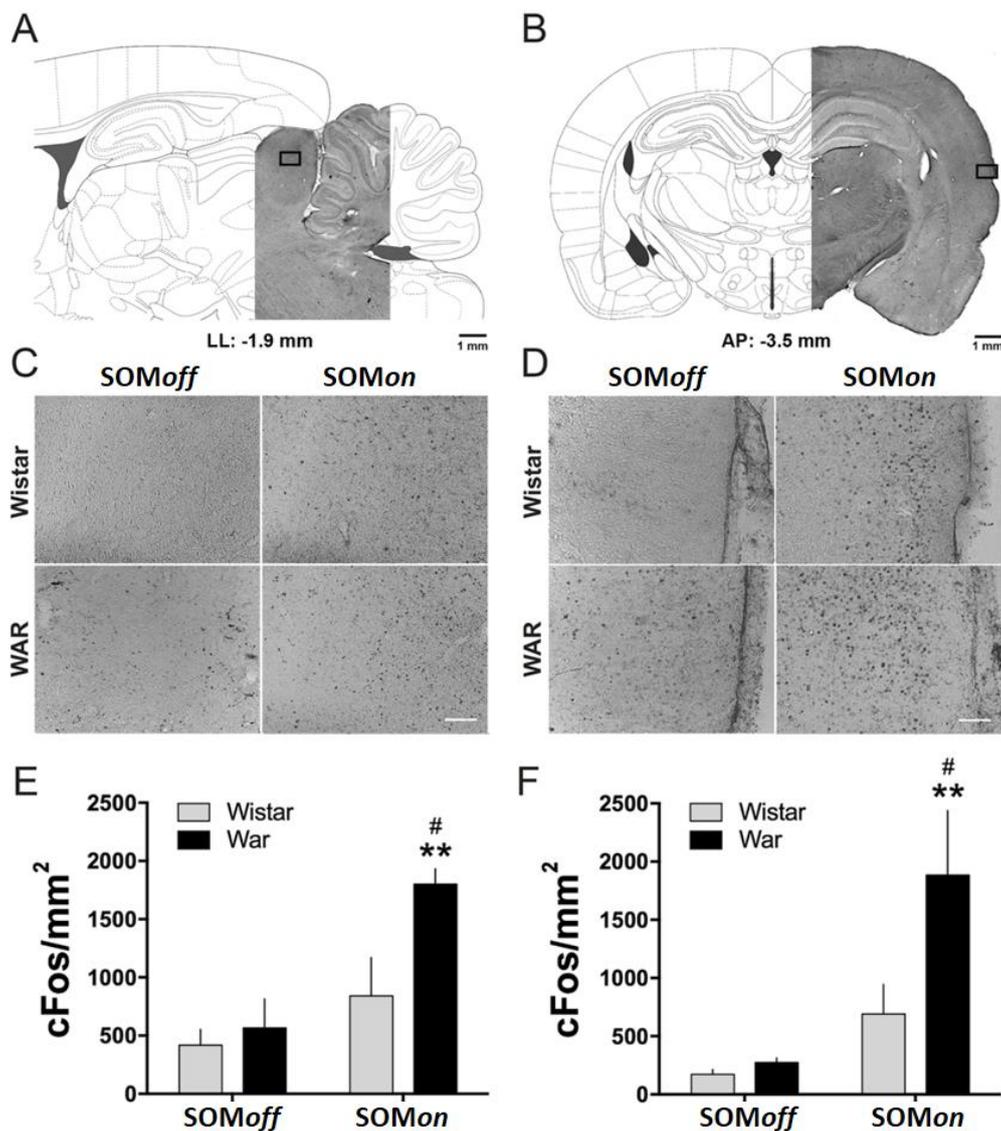


Figura 08: Expressão de c-Fos nas regiões de interesse analisadas. A-B. Figuras ilustrativas do CI e LTA. As imagens foram capturadas utilizando-se lente de aumento de 5x. Escala da barra: 1mm. C-D. Figuras ilustrativas dos diferentes grupos analisados com e sem a estimulação sonora a 85 SPL. As imagens foram capturadas utilizando-se lente de aumento de 20x. Escala da barra: 200 μ m. E-F. Número de células marcadas por c-FOS por unidade de área (mm²). SOMon: grupo com estimulação auditiva. SOMoff: grupo sem estimulação auditiva. Os dados estão representados como média \pm S.E.M.

Como demonstrado a seguir, sugerimos por meio dos três testes comportamentais controle que o WAR não possui um déficit na atividade motora, em comparação com os animais controle.

No primeiro teste realizado, avaliado por meio do “Teste de campo aberto”, podemos sugerir que o WAR não possui déficit de locomoção espontânea. Os animais experimentais não apresentaram diferenças estatísticas na distância percorrida ($p = 0,5976$) ou no tempo de mobilidade ($p = 0,0633$) durante a realização do teste, em relação ao grupo controle (Figura 09).

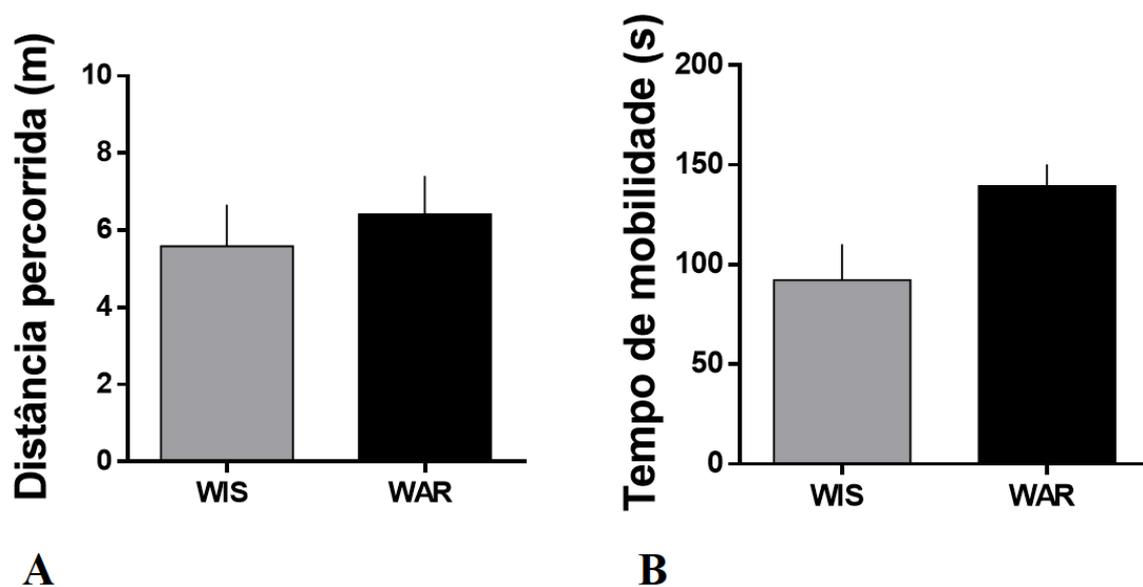


Figura 09: Desempenho dos animais no Teste de campo aberto. A. Distância (m) percorrida pelo roedor em um período de 05 minutos. B. Tempo (s) de mobilidade do roedor em um período de 05 minutos. Os dados estão representados como média \pm S.E.M.

Ademais, por meio do segundo teste comportamental controle, podemos sugerir que o WAR não apresenta déficit de locomoção motora, avaliado pelo “Teste Rotarod”. Os animais experimentais não apresentaram diferenças significativas na latência para a primeira queda ($F_{1,30} = 1,974$; $p = 0.7621$) ou no número de quedas do cilindro giratório ($F_{1,30} = 0.7052$; $p > 0.9999$) em relação ao grupo controle (Figura 10).

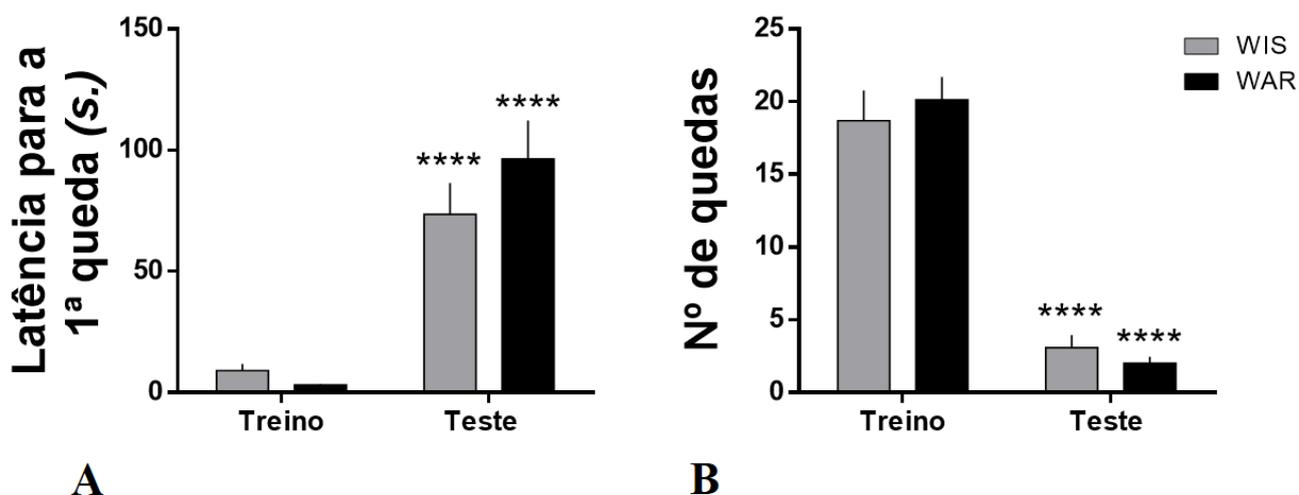


Figura 10: Desempenho dos animais no Teste Rotarod. A. Latência (s) para a primeira queda durante o treino e teste. B. Número de quedas durante o treino e teste. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. *: diferenças intra-grupos. #: diferenças inter-grupos.

E por fim, de forma similar aos outros testes comportamentais, podemos sugerir por meio do “Teste de assimetria bilateral” que o WAR não apresenta déficit sensório-motor. Os animais experimentais não apresentaram diferenças significativas na latência para a remoção da fita crepe das patas dianteiras ($p= 0,0871$) em relação ao grupo controle (Figura 11).

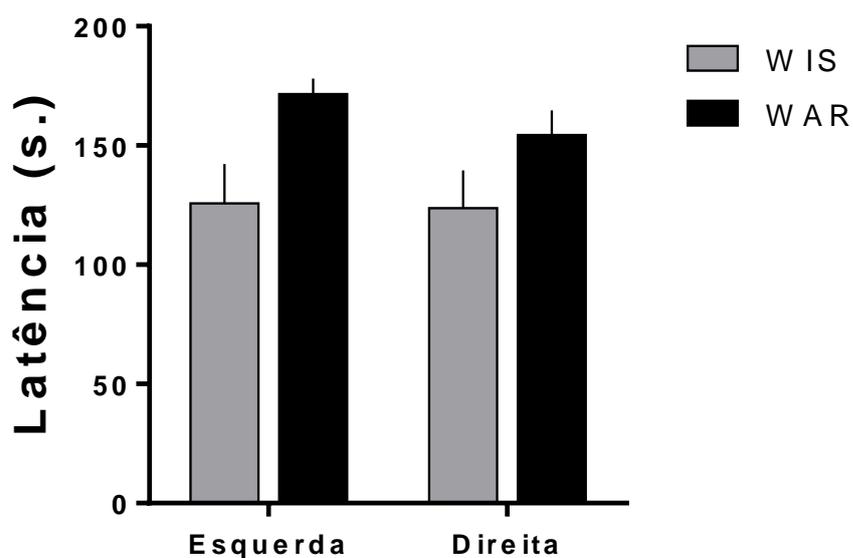


Figura 11: Desempenho dos animais no Teste de assimetria bilateral. A latência (s) para a retirada das fita crepe das patas dianteiras direita e esquerda foram quantificadas. Os dados estão representados como média \pm E.P.M.

Portanto, uma vez demonstrado que o WAR não possui um déficit locomotor, submetemos estes animais à tarefa de condicionamento ao medo auditivo.

Conforme esperado, os animais controles apresentaram evocação normal da memória da tarefa aversiva, expressada pelo aumento significativo do comportamento de congelamento durante a sessão do TT, apenas no grupo pareado ($F_{1,28} = 46,03$; $p < 0.0001$). Ainda, não houve aumento significativo do congelamento no dia do TT para os animais controles no grupo não pareado ($F_{1,27} = 0,1243$; $p = 0.7306$) (Figura 12).

Entretanto, o WAR apresentou um percentual de congelamento semelhante ao da sessão PT nos grupos pareado ($F_{1,28} = 46,03$; $p > 0.9999$) e não pareado ($F_{1,27} = 0,1243$; $p > 0.9999$) (Figura 12).

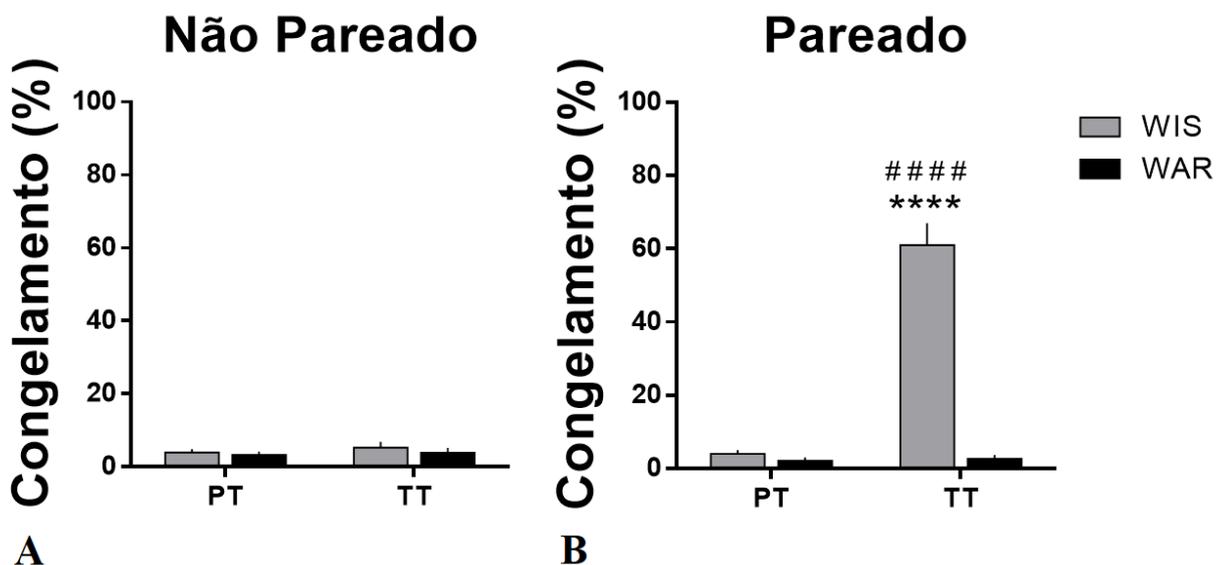


Figura 12: Porcentagem de comportamento de congelamento durante as apresentações do EC no protocolo de condicionamento ao medo auditivo no grupo não pareado (A) e pareado (B). O aprendizado associativo levou ao condicionamento do comportamento de congelamento. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. *: diferenças intra-grupos. #: diferenças inter-grupos.

Estes resultados sugerem a existência de um comprometimento no aprendizado do WAR nesta tarefa de associação aversiva, uma vez que não manifestaram a resposta condicionada no dia do TT.

Uma vez identificado o comprometimento da evocação da memória aversiva do WAR, por meio da não manifestação das respostas condicionadas no paradigma de condicionamento ao medo auditivo, fizemos uma seleção dos animais que apresentavam os implantes de eletrodos nas áreas de interesse.

Somente os animais que possuíam os eletrodos inseridos no núcleo central do CI direito e núcleo lateral da amígdala direita foram utilizados para realizar-se as análises eletrofisiológicas dos PEArp.

Abaixo, podemos observar as marcações dos eletrodos de registro nos substratos de interesse após realizada as análises histológicas (Figura 13).

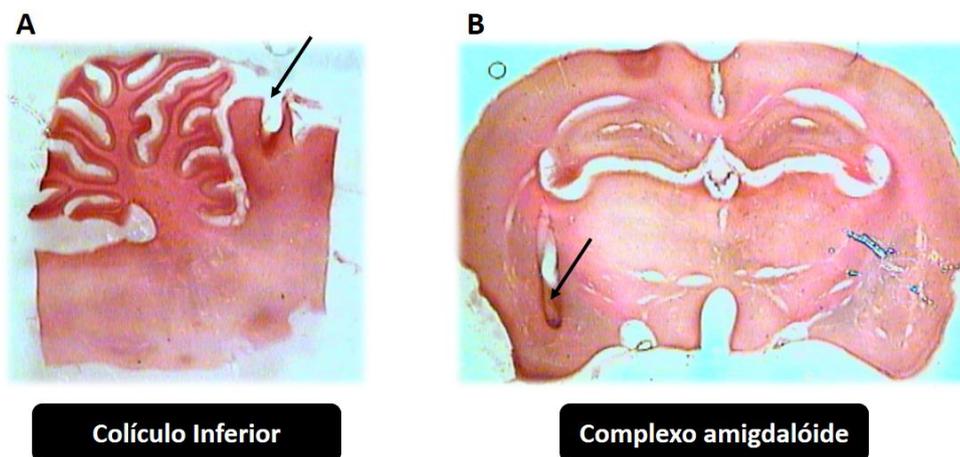


Figura 13: Confirmação do posicionamento dos eletrodos de registro. A. Posicionamento do eletrodo de registro no núcleo central do CI em um corte sagital a uma espessura de 40 μ m. Coordenadas: AP: -9,0 mm, LL: -1,4 mm, DV: -4,0 mm. B. Posicionamento do eletrodo de registro no núcleo lateral do complexo amigdalóide em um corte coronal a uma espessura de 40 μ m. Coordenadas: AP: -2,8 mm, LL: -5,0 mm, DV: -7,2 mm. As setas indicam o local no qual o eletrodo estava posicionado.

Após realizada a histologia foi constatado que 30 animais possuíam eletrodos corretamente posicionados no CI (Grupo pareado: 10 Wistars e 06 WARs; Grupo não pareado: 07 Wistars e 07 WARs) e 29 animais possuíam eletrodos corretamente posicionados no LA (Grupo pareado: 09 Wistars e 06 WARs; Grupo não pareado: 08 Wistars e 06 WARs). Somente estes animais foram utilizados para realizarem-se as análises dos PEArp.

Todos os animais utilizados neste trabalho apresentaram um aumento de energia exatamente na *fm* proposta: 53.71Hz, como mostrado nas figuras ilustrativas abaixo (Figuras 14-15):

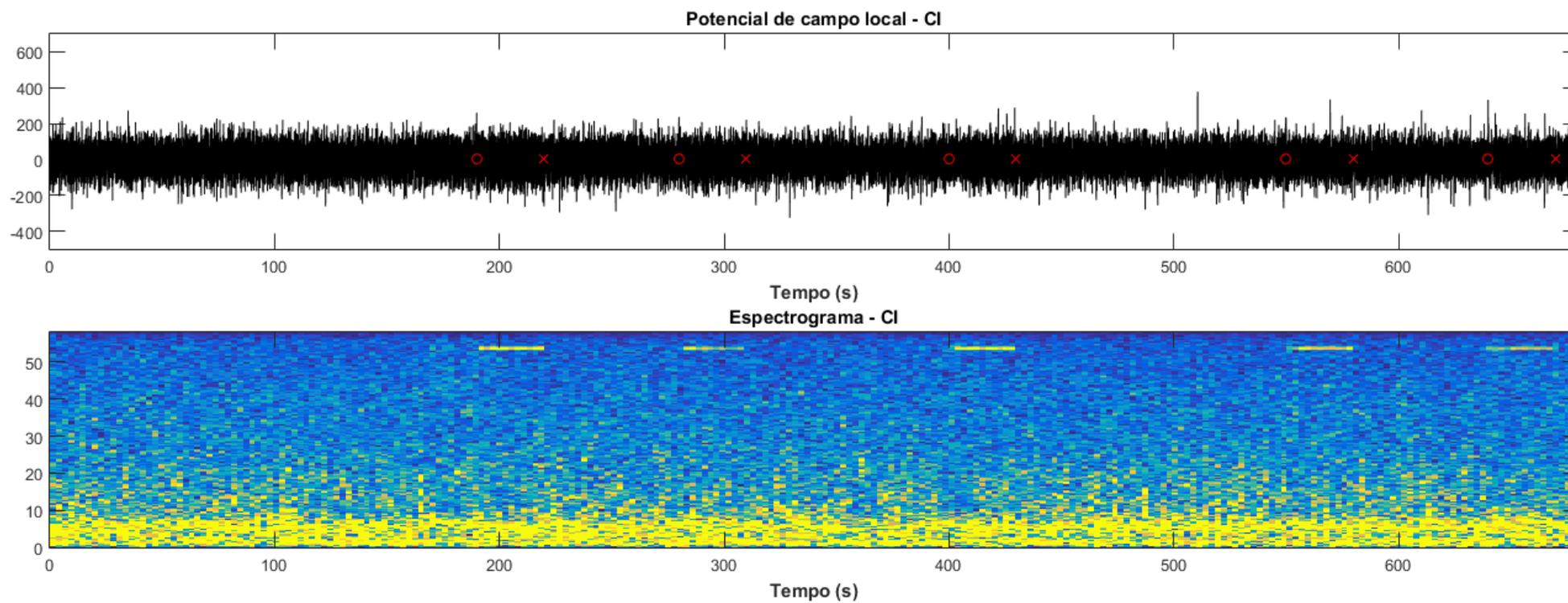


Figura 14: Imagem ilustrativa do Potencial de campo local e espectrograma dos PEArp do CI de um animal controle (WIS). O símbolo (o) representa o momento no qual a estimulação sonora se iniciou e o símbolo (x) representa o final da estimulação sonora. PEArp evidenciado exatamente na Fm 53.71Hz.

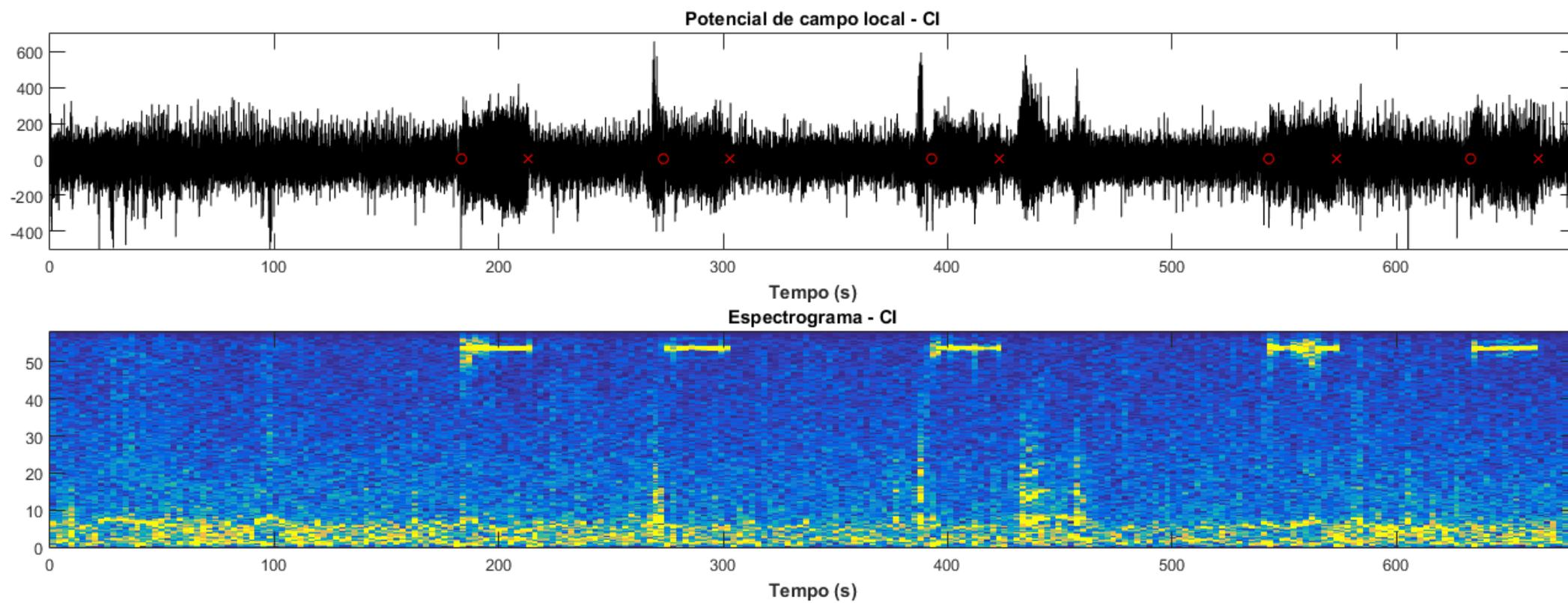


Figura 15: Imagem ilustrativa do Potencial de campo local e espectrograma dos PEArp do CI de um animal experimental (WAR). O símbolo (o) representa o momento no qual a estimulação sonora se iniciou e o símbolo (x) representa o final da estimulação sonora. PEArp evidenciado exatamente na Fm 53.71Hz.

Avaliando-se a média das *Anorm* durante os 5 *trials* de estimulação da sessão de PT, podemos observar que a energia utilizada pelo CI para processamento do EC nos grupos pareado ($F_{1,14} = 0.002596$; $p = 0.0037$) e não pareado ($F_{1,12} = 0.1995$; $p < 0.0001$) é notoriamente maior que o grupo controle (Figura 16A e Figura 17A, respectivamente). Logo, apresentamos mais um dado, em concordância com os resultados da imunohistoquímica, que reforça a hiperexcitabilidade encontrada no CI do WAR.

Entretanto, quando realizamos a análise intra-grupo para compararmos o nível de ativação das células do CI durante o PT e o TT, diferenças estatísticas entre as energias normalizadas não foram encontradas. Em outras palavras, a energia normalizada evocada no CI durante o PT no Wistar (Grupo pareado: $F_{1,14} = 0.002596$; $p = 0.6075$ / Grupo não-pareado: $F_{1,12} = 0.1995$; $p > 0.9999$) e no WAR (Grupo pareado: $F_{1,14} = 0.002596$; $p = 0.7755$ / Grupo não-pareado: $F_{1,12} = 0.1995$; $p > 0.9999$) foram semelhantes à evocada no dia do TT (Figura 16A).

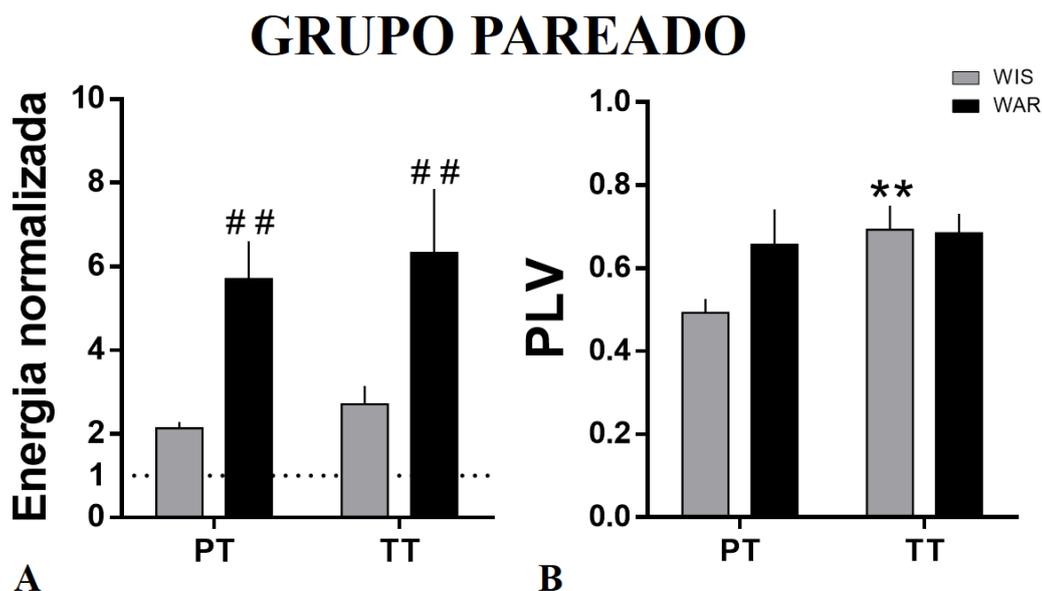


Figura 16: Caracterização dos PEArp do CI no grupo pareado do Protocolo de condicionamento ao medo auditivo. **A.** Média das $Anorm$ para fm 53.71Hz durante o PT e TT. **B.** Média dos valores de PLV durante o PT e TT. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. *: diferenças intra-grupos. #: diferenças inter-grupos.

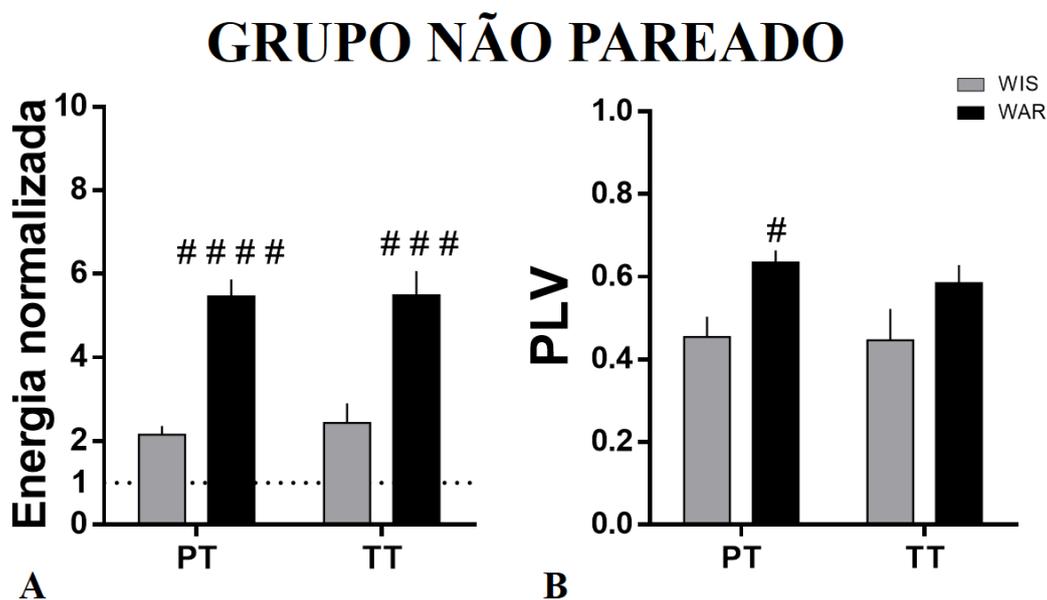


Figura 17: Caracterização dos PEArp do CI no grupo não pareado do Protocolo de condicionamento ao medo auditivo. **A.** Média das $Anorm$ para fm 53.71Hz durante o PT e TT. **B.** Média dos valores de PLV durante o PT e TT. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. *: diferenças intra-grupos. #: diferenças inter-grupos.

Posteriormente avaliamos os resultados intra-grupo referentes ao PLV, observando um aumento estatístico em seus valores somente nos Wistars ($F_{1,14} = 3.522$; $p = 0.0063$) no TT, no grupo pareado. Ainda, não houve aumento significativo do PLV no dia do TT para os animais controles no grupo não pareado ($F_{1,12} = 0,1909$; $p > 0.9999$) (Figura 17B).

De forma semelhante à análise comportamental, o grupo experimental não obteve um aumento dos valores do PLV nos grupos pareado ($F_{1,14} = 3.522$; $p > 0.9999$) e não pareado ($F_{1,12} = 0,1909$; $p = 0.9455$), no dia do TT (Figura 15B-16B).

Estes dados sugerem que somente o grupo controle pareado apresentou um maior acoplamento de fase do CI em relação ao EC no dia do TT, sugerindo ter havido um aprendizado na tarefa de condicionamento ao medo auditivo.

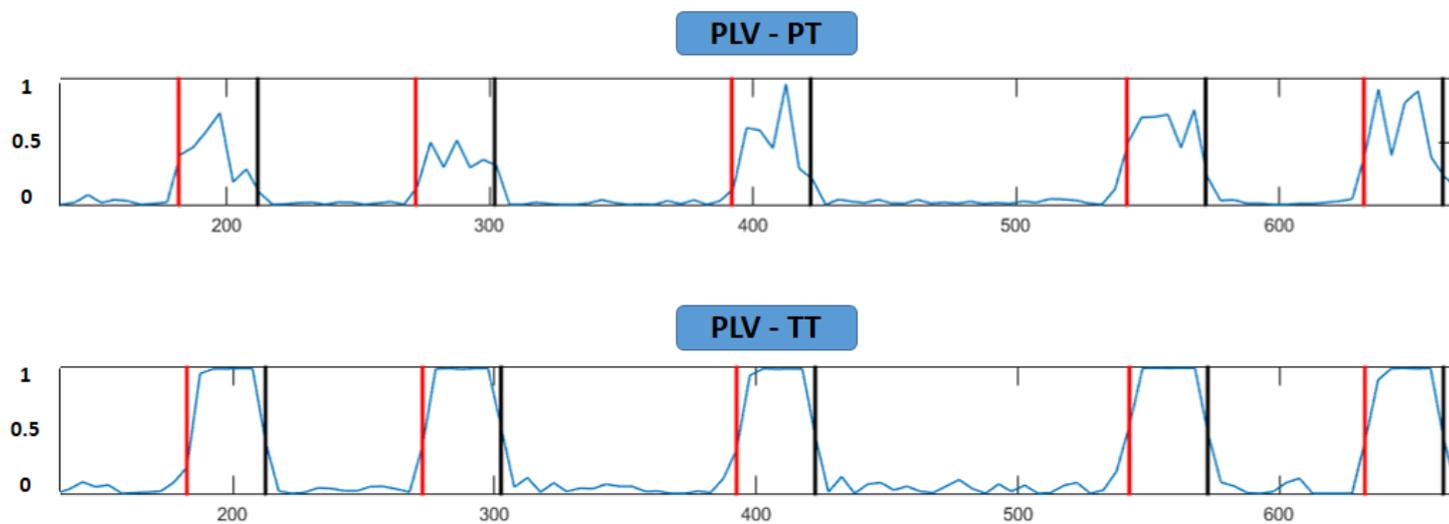


Figura 18: Figura ilustrativa dos valores do PLV, de um animal controle (WIS), durante a apresentação do EC no PT e no TT. PEArp registrado no CI.

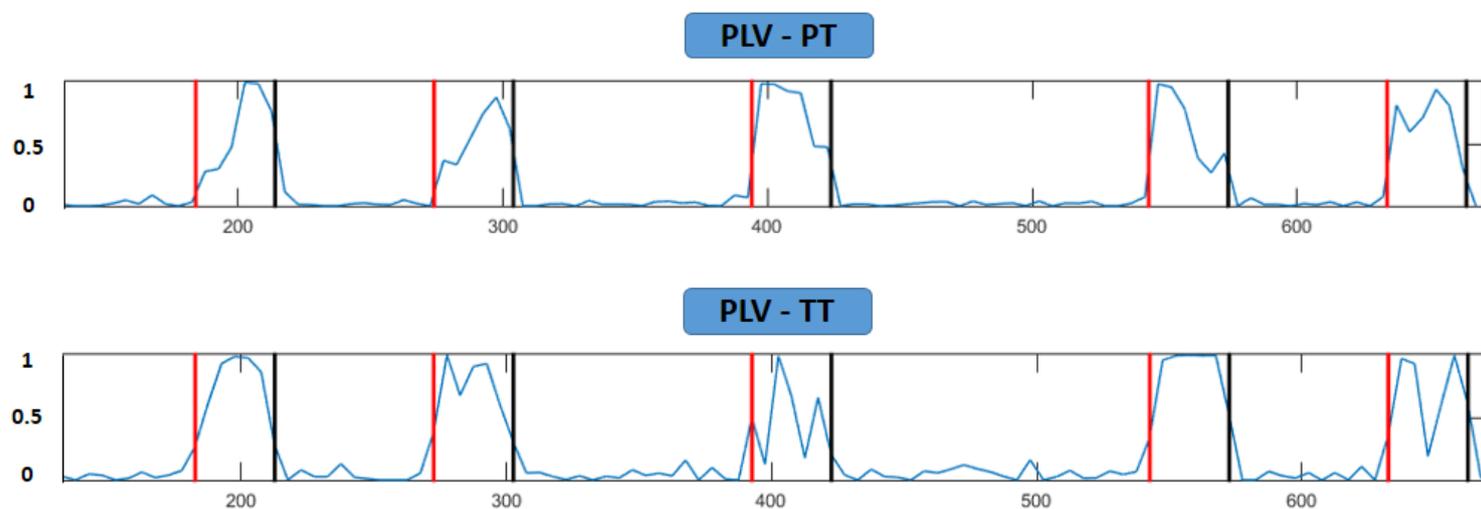


Figura 19: Figura ilustrativa dos valores do PLV, de um animal experimental (WAR), durante a apresentação do EC no PT e no TT. PEArp registrado no CI.

Concomitante as análises dos PEArp no CI, realizamos também as análises dos PEArp em LA. Diferentemente do CI, o LA não faz parte da via auditiva, sendo avaliado neste trabalho como o substrato no qual a associação entre os EC e ENC se interagem. Logo, é razoável esperar-se que a média das *Anorms* encontradas em LA seriam bem menores em comparação às encontradas no CI (Figura 20A e Figura 21A).

Ainda, realizando-se as análises inter-grupos das *Anorm*, não foram identificadas nenhuma diferença estatística no PT ($F_{1,13} = 0.002133$; $p > 0.9999$) e no TT ($F_{1,13} = 0.002133$; $p > 0.9999$) no grupo pareado. A mesma tendência se estendeu pelo grupo não pareado, não havendo também nenhuma diferença estatística no PT ($F_{1,12} = 0.5468$; $p > 0.9999$) e no TT ($F_{1,12} = 0.5468$; $p = 0.3219$).

Da mesma forma, quando realizadas as análises intra-grupos das *Anorms*, também não foram identificadas nenhuma diferença estatística entre os grupos pareado ($F_{1,13} = 0.002133$; WIS: $p = 0.8507$ / WAR: $p = 0.9547$) e não pareado ($F_{1,12} = 0.5468$; WIS: $p = 0.2961$ / WAR: $p > 0.9999$). Ou seja, avaliando-se a amplitude dos PEArp do LA não podemos afirmar que houve um aumento da energia durante o processamento do EC no TT (Figura 20A e Figura 21A).

Por outro lado, de uma maneira bem clara, podemos observar que somente o grupo pareado dos animais controle apresentaram um aumento significativo dos níveis do PLV no dia do TT ($F_{1,13} = 2.717$; $p = 0.0087$ / Figura 19B) em relação ao TR. Nenhum diferença estatística foi identificada no grupo não pareado ($F_{1,12} = 0.07702$; $p > 0.9999$ / Figura 21B).

Ademais, nenhuma diferença estatística foi encontrada nos grupos pareado ($F_{1,13} = 2.717$; $p > 0.9999$ / Figura 20B) e não pareado ($F_{1,12} = 0.07702$; $p > 0.9999$ / Figura 21B) do WAR nas análises de PLV.

Seguindo o mesmo padrão encontrado nos PEArp do CI, estes dados sugerem que somente o grupo controle pareado apresentou um maior acoplamento de fase em relação ao EC no dia do TT.

GRUPO PAREADO

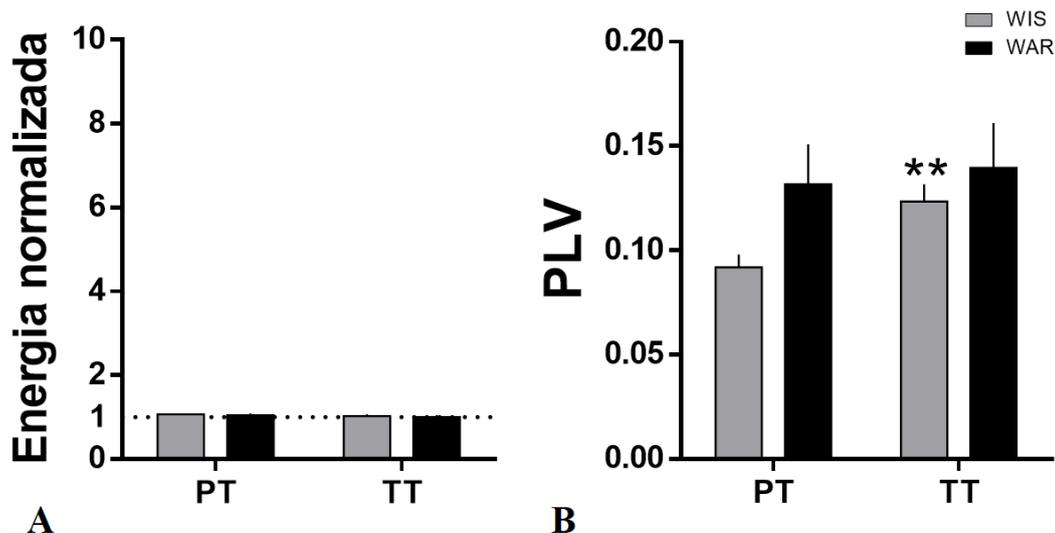


Figura 20: Caracterização dos PEARp do LA no grupo pareado do Protocolo de condicionamento ao medo auditivo. **A.** Média das $Anorm$ para fm 53.71Hz durante o PT e TT. **B.** Média dos valores de PLV durante o PT e TT. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. *: diferenças intra-grupos. #: diferenças inter-grupos.

GRUPO NÃO PAREADO

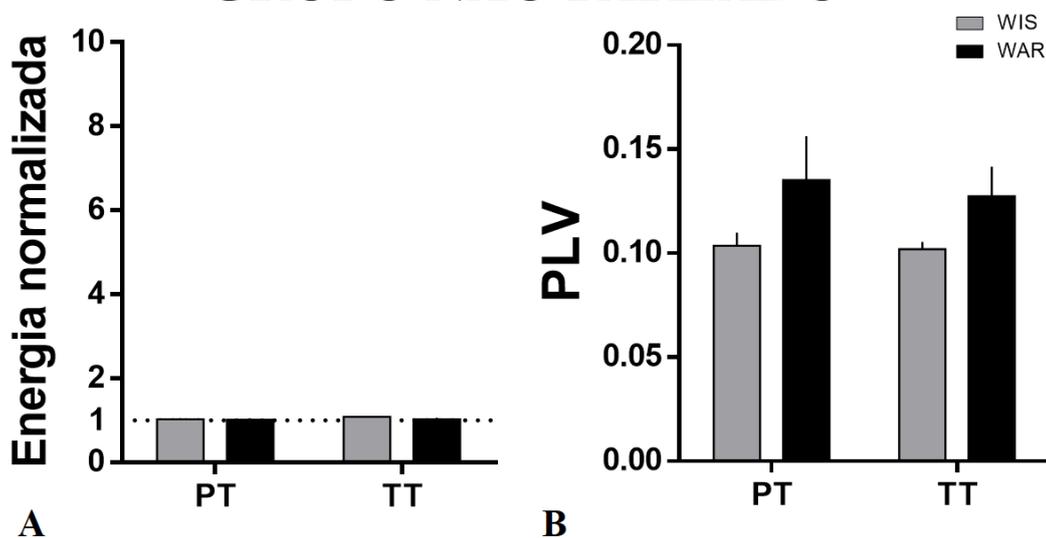


Figura 21: Caracterização dos PEARp do LA no grupo não pareado do Protocolo de condicionamento ao medo auditivo. **A.** Média das $Anorm$ para fm 53.71Hz durante o PT e TT. **B.** Média dos valores de PLV durante o PT e TT. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. *: diferenças intra-grupos. #: diferenças inter-grupos.

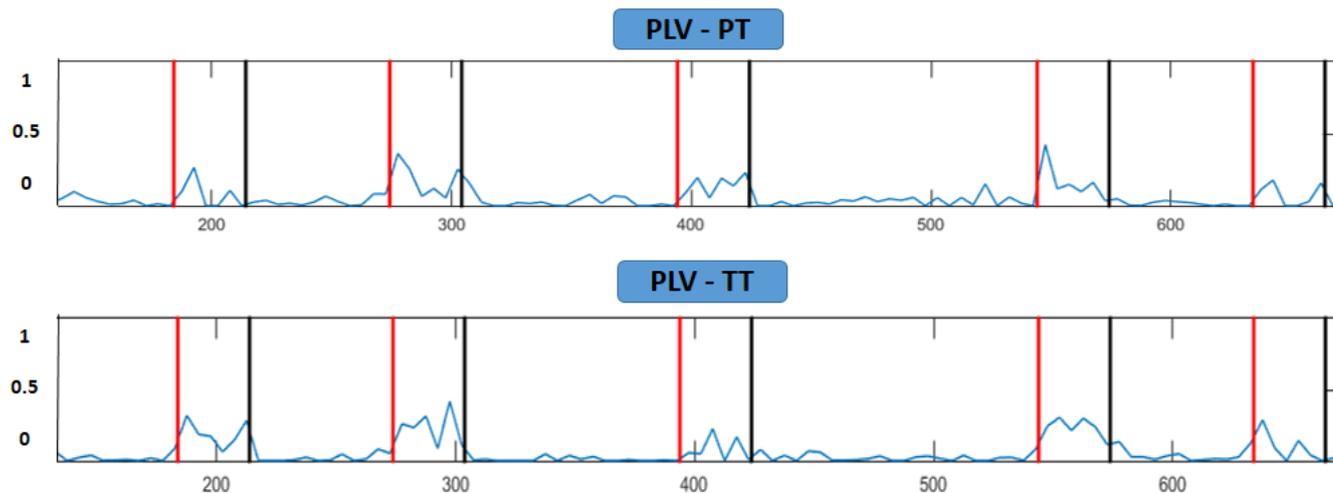


Figura 22: Figura ilustrativa dos valores do PLV, de um animal controle (WIS), durante a apresentação do EC no PT e no TT. PEArp registrado no LA.

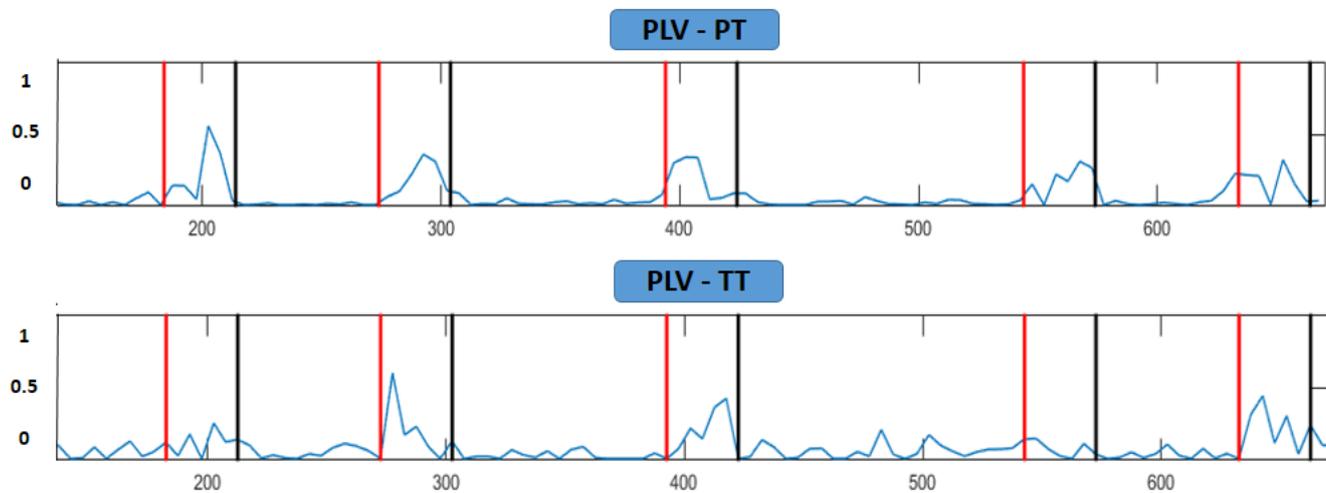
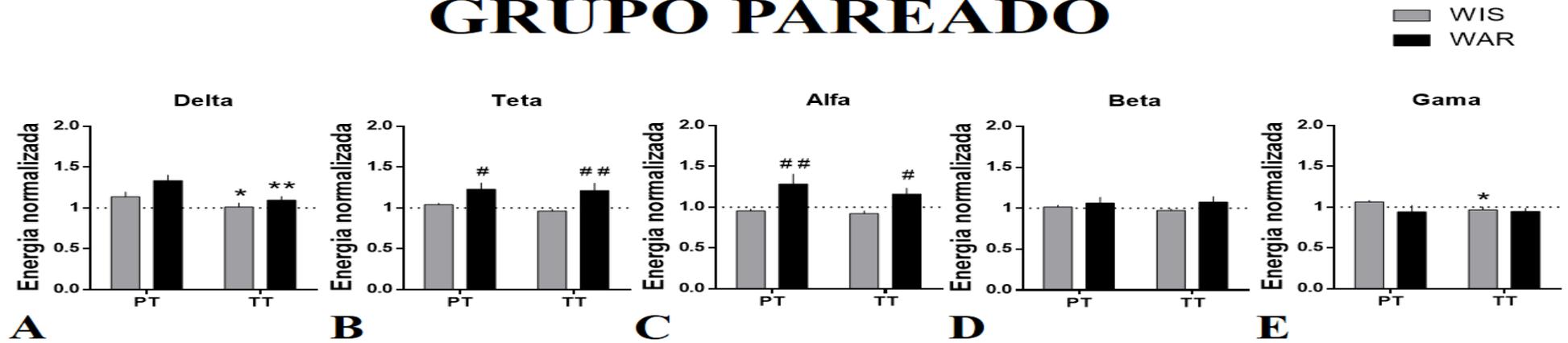


Figura 23: Figura ilustrativa dos valores do PLV, de um animal controle (WAR), durante a apresentação do EC no PT e no TT. PEArp registrado no LA.

A composição espectral do LFP no CI e LA, nas bandas de frequências adjacentes, também foi avaliada (Figuras 24-25). Os valores de energia foram normalizados pelo período basal, ou seja, o período de pré-estímulo no qual não havia som.

Esta análise foi utilizada como um resultado controle, tendo o intuito de demonstrar que o estímulo sonoro foi subliminar à CA, ou seja, não foi capaz de induzir a convulsão nos animais. Podemos observar que em todos os grupos os valores de energia ficaram sempre em torno de 1 em todas as bandas de frequência analisadas, durante os períodos de apresentação do estímulo sonoro. Sabe-se que há uma notória e drástica redução estatística dos valores de energia (intra-grupo) nas bandas de frequência no momento da estimulação sonora se a convulsão ocorrer (Pinto, 2017). Desta forma, nossos achados sugerem que a estimulação sonora utilizada neste protocolo não induziu a CA nos animais experimentais e controles.

GRUPO PAREADO



GRUPO NÃO PAREADO

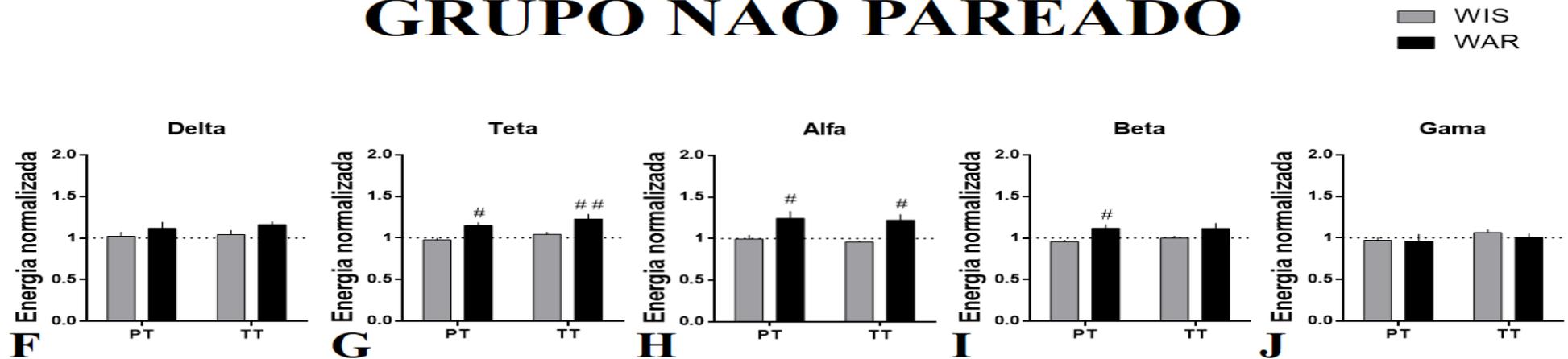
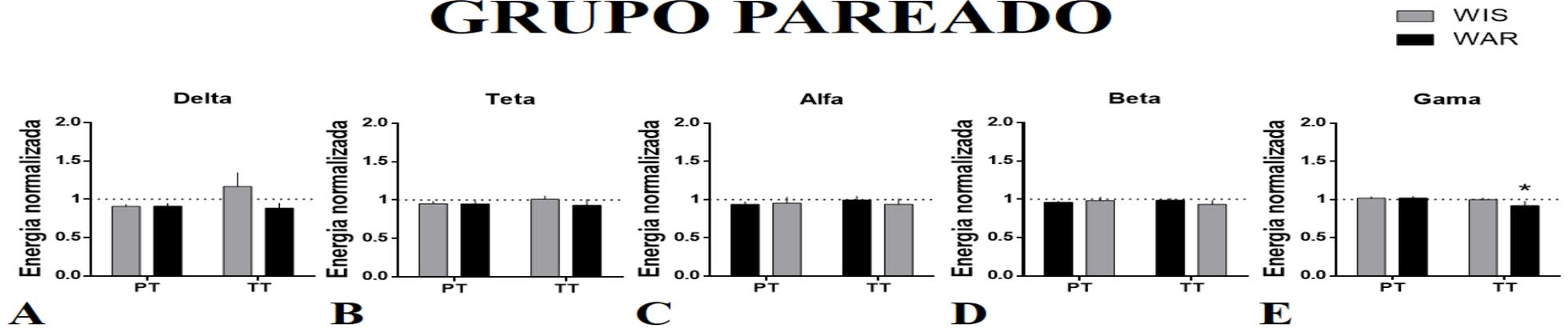


Figura 24: Média das Anorm da composição espectral a partir do registro no CI durante o PT e TT nos grupos pareado (A-E) e não pareado (F-J). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. *: diferenças intra-grupos. #: diferenças inter-grupos.

GRUPO PAREADO



GRUPO NÃO PAREADO

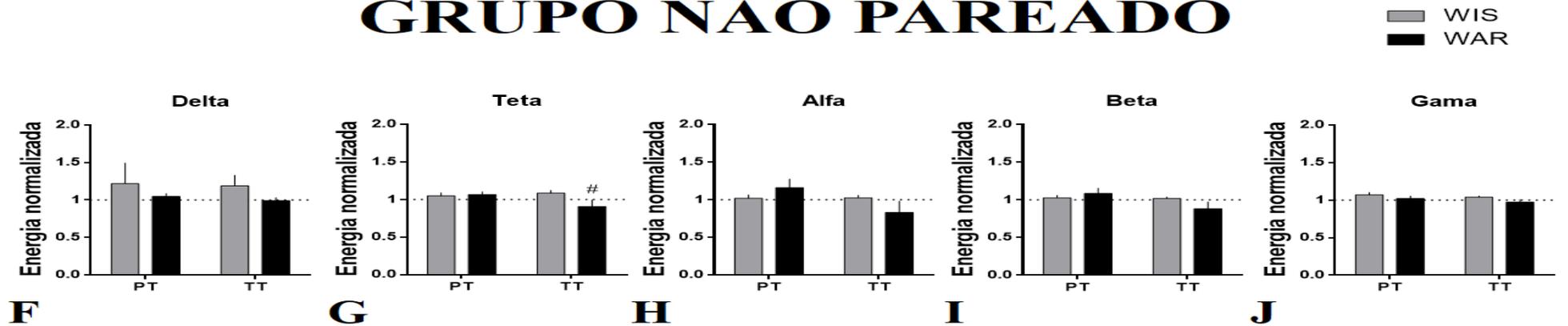


Figura 25: Média das Anorm da composição espectral a partir do registro no LA durante o PT e TT nos grupos pareado (A-E) e não pareado (F-J). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. *: diferenças intra-grupos. #: diferenças inter-grupos.

Portanto, podemos sugerir até o momento que os animais controle pareados apresentaram durante o TT a resposta condicionada de congelamento, bem como um aumento de acoplamento de fase entre o LA-EC e CI-EC. Entretanto, o WAR não apresentou a resposta condicionada de congelamento e não apresentou o aumento de acoplamento entre os substratos estudados e o EC. Ainda, podemos sugerir que nenhum animal apresentou a CA.

Logo, podemos sugerir que o WAR não aprendeu a tarefa de condicionamento ao medo auditivo, apresentando um déficit cognitivo neste paradigma específico.

Por conseguinte, decidimos submeter os animais experimentais a uma tarefa de condicionamento contextual, a qual utiliza o ambiente como um EC. O objetivo deste protocolo foi o de avaliar o aprendizado do WAR em uma tarefa na qual a junção de várias modalidades sensoriais seriam utilizadas como EC. Ou seja, se realmente a hipótese levantada neste trabalho estiver correta, o WAR não conseguiria associar o EC unimodal (som) ao ENC no grupo pareado, porém, conseguiria realizar a associação se outras vias sensoriais fossem ativadas (EC multimodal, como por exemplo: o ambiente).

Assim, realizamos o protocolo de condicionamento ao medo contextual. Como esperávamos, o WAR apresentou somente no dia do TT uma resposta condicionada de congelamento ($F_{1,18} = 0.4570$; $p < 0.0001$) semelhante ao Wistar ($F_{1,18} = 0.4570$; $p < 0.0001$), no grupo experimental. Entretanto, nenhum comportamento de congelamento foi observado no TT no WAR ($F_{1,12} = 0.04990$; $p > 0.9999$) ou no Wistar ($F_{1,12} = 0.04990$; $p > 0.9999$) no grupo controle (Figura 26).

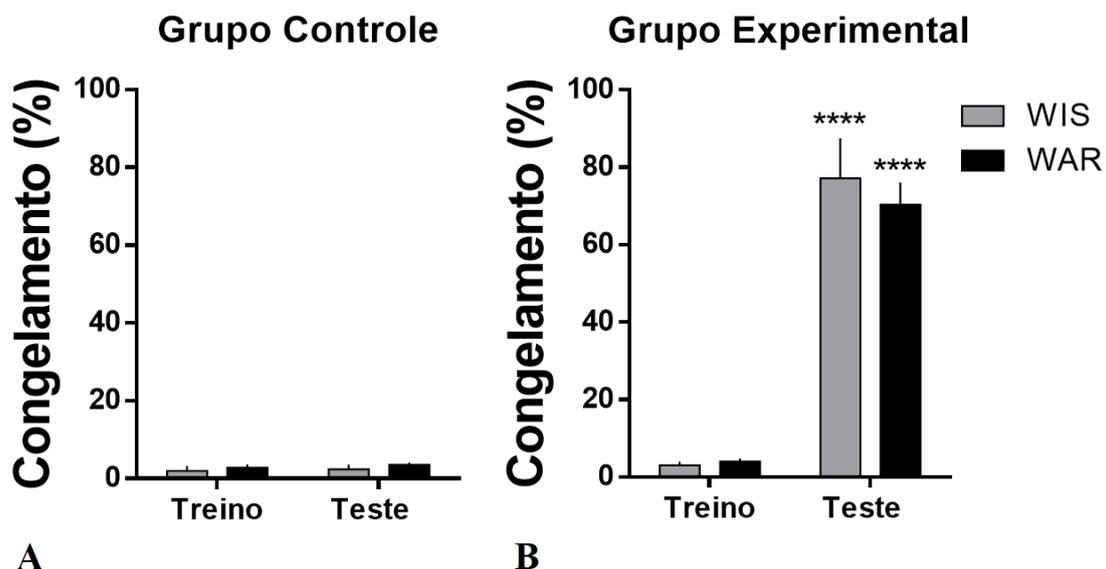


Figura 26: Porcentagem de comportamento de congelamento durante o protocolo de condicionamento contextual no grupo controle (A) e experimental (B). O aprendizado associativo levou ao condicionamento do comportamento de congelamento. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. *: diferenças intra-grupos. #: diferenças inter-grupos.

Posteriormente decidimos realizar o teste de reconhecimento de objeto. O desenvolvimento deste teste teve como objetivo demonstrar o aprendizado do WAR em mais uma tarefa que fosse independente da via auditiva e independente do complexo amigdalóide, reforçando mais uma vez a hipótese criada neste trabalho.

Assim, também como esperado, podemos sugerir com base nos dados apresentados a seguir que o WAR foi capaz de reconhecer o objeto novo, apresentando um tempo maior de exploração no objeto não familiar (Figura 27). Estes resultados não possuíram diferenças estatísticas do grupo controle, sugerindo que houve um aprendizado satisfatório nesta tarefa em ambos os grupos ($p = 0.7245$).

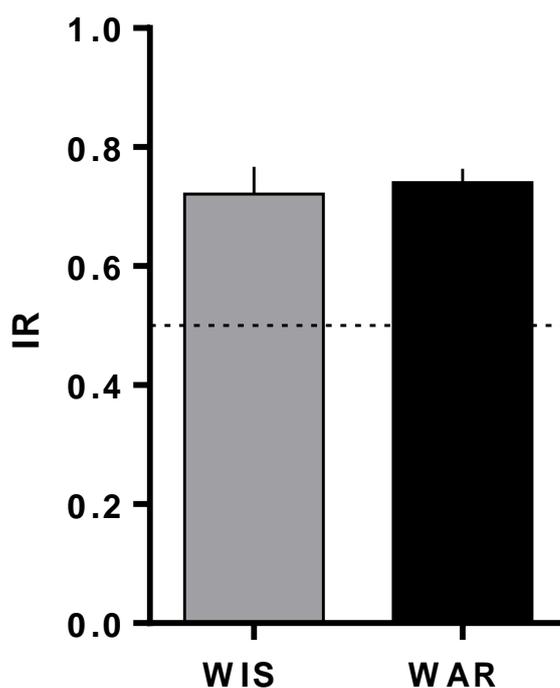


Figura 27: Desempenho dos animais no Teste de reconhecimento de objeto novo. O índice de reconhecimento (IR) foi utilizado para avaliar a memória de longa duração dos animais. Os dados estão representados como média \pm S.E.M.

6. DISCUSSÃO

Podemos observar, com base nos dados comportamentais e eletrofisiológicos deste estudo, que o grupo controle (Wistar) aprendeu a tarefa de condicionamento ao medo auditivo, entretanto o WAR não.

Com relação aos resultados comportamentais, sabe-se que o congelamento é utilizado na literatura como certificação de que o protocolo de condicionamento ao medo foi efetivo em gerar o aprendizado associativo. Observou-se neste trabalho que durante o PT, os níveis de congelamento para todos os grupos (WAR: pareado e não pareado / Wistar: pareado e não pareado) foram semelhantes. Entretanto, após o condicionamento ao medo auditivo, apenas o grupo pareado controle (Wistar) mostrou aumento no comportamento de congelamento em relação aos seus valores do PT. Ainda, o fato de os grupos não-pareado terem apresentado a resposta comportamental esperada de um controle, com taxas de congelamento igualmente baixas, tanto no PT como no TT, mostra que o protocolo comportamental usado foi efetivo em atribuir uma valência neutra ao contexto A. Vale a pena ressaltar que todos os animais utilizados para realizar-se os protocolos foram escolhidos de forma randômica. Desta forma, estes resultados são um controle importante que evidenciam que não há viés comportamentais nos grupos avaliados, sendo o comportamento de congelamento consequente de um aprendizado associativo entre o EC-ENC.

Abstendo-se aos resultados eletrofisiológicos podemos perceber que não houve no dia do TT um aumento significativo nos valores da amplitude da resposta evocada no CI e LA em comparação ao PT em nenhum grupo. Entretanto, observamos um aumento nos valores de PLV nestes substratos no dia do TT, somente no grupo pareado controle (Wistar). Estes dados corroboram em parte com os resultados publicados recentemente

pelo nosso laboratório, os quais avaliaram os PEArp durante o paradigma de condicionamento ao medo auditivo. Neste trabalho, registros eletrofisiológicos também realizados no CI, utilizando a mesma fm (53.71Hz) e fc (10.000Hz), mostraram uma dinâmica semelhante nos PEArp em comparação ao nosso trabalho. Os valores de fase no dia do TT encontravam-se em uma variabilidade menor (aumento de acoplamento de fase com o EC) concomitante a um aumento da amplitude do sinal dos PEArp (Lockmann, 2017). Esta dinâmica neuronal tem sido interpretada como um processo de sincronização neural induzido pela aquisição de relevância pelo EC (Lockmann, 2017; Mark, 1967; Ji, 2009) em tarefas de condicionamento ao medo. Acredita-se que estas alterações nos PEArp dependentes de aprendizado se deva pela modulação de outros substratos que se conectam ao CI. Como estamos tratando de uma via ativada em estado estável, considera-se que todas as projeções envolvidas no processamento do EC estão ativadas quando avaliamos a atividade dos neurônios do CI. Portanto, podemos sugerir que a fase do sinal registrado em fm no CI e LA reflete a somação sináptica de todos os osciladores que trabalham na interpretação da informação.

Dando continuidade ao raciocínio utilizado no trabalho do Lockmann *et. al.*, 2017, os nossos achados referentes aos PEArp no LA dão suporte à ideia de que a fase, como reflexo temporal da integração sináptica, 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.

Sugerimos então que as mudanças de fase encontradas nos PEArp do CI no TT possam refletir uma participação maior da atividade de neurônios do LA, somente no grupo que possuiu a aquisição de relevância do EC (controle pareado - Wistar). Acreditamos que essa modulação se deva por projeção indireta AMY - CI, uma vez que

até o momento não foram descritas na literatura projeções diretas entre estes substratos em roedores (Wistar e /ou WAR).

Ademais, o fato de que a dinâmica temporal das alterações de fase do LA ser similar às alterações encontradas no CI (aumento dos níveis de PLV somente no grupo controle pareado no TT), reforça ainda mais a hipótese de que exista uma modulação *top-down* mediada pelo AMY.

Contudo, em divergência com o trabalho do Lockmann *at al* (2017), nosso trabalho não apresentou um aumento da amplitude do sinal concomitantemente a diminuição da dispersão dos valores de fase, após o condicionamento ao medo. Podemos discutir este dado supondo que o aumento da energia em uma determinada banda de frequência pode ser entendido como uma maior sincronização de disparos locais (independente de amplitude) e/ou um aumento do recrutamento de neurônios que compõe uma mesma rede neural reverberante (Varela, 2001). Dessa forma, acreditamos que em nosso trabalho conseguimos visualizar somente uma maior sincronização de disparos locais, demonstrada pelas análise de dispersão dos valores de fase.

Por outro lado, não identificamos modificações nos componentes espectrais (amplitude e fase) dos PEArp do WAR, em nenhum dos substratos neurais após o condicionamento ao medo auditivo, em ambos os grupos (pareado e não pareado). Como o aprendizado associativo gerou mudanças na fase do PEArp do grupo controle, sugerimos que a aquisição de relevância do EC por um processo específico de aprendizado associativo não ocorreu no WAR. Acreditamos que este prejuízo cognitivo seja consequente da facilitação acústico-límbica encontrada nestes animais (Magalhães, 2004; Scarlatelli-Lima, 2003; Moraes, 2000; Hirsch, 1997). Defendemos esta hipótese baseado nos resultados eletrofisiológicos e imunohistoquímicos apresentados neste trabalho, os quais corroboram com achados também realizados em WARs na literatura

epileptogênica (Hirsch, 1997; Pinto, 2017; Drumond, 2011; Moraes, 2000). Nossos resultados sugerem que o circuito de processamento sensorial sonoro do WAR apresenta uma predisposição anormal e elevada para responder a estímulos sonoros, gerando por sua vez a hiperexcitabilidade encontrada no CI e LTA (Figura 08). Esta facilitação da via acústica pode prejudicar a interpretação da relevância do estímulo sonoro, uma vez que a diferentes intensidades (85dB e 110dB), o WAR responde com o mesmo padrão elevado de ativação neuronal (Pinto, 2017).

Ainda, alguns estudos sugerem que o AMY do WAR também possui esta facilitação para ativação em animais abrasados (Moraes, 2000; Hirsch, 1997) e não abrasados (Magalhães, 2004; Scarlatelli-Lima, 2003). Acreditamos que esta hiperativação do AMY prejudicou o aprendizado do WAR na tarefa de condicionamento ao medo auditivo, uma vez que a associação do EC-ENC no dia do TR ocorreu de forma exacerbada. Em outras palavras, devido a facilitação amigdalar, o WAR não foi capaz de associar somente o som (EC) ao fornecimento presumível do choque nas patas, mas também atrelou os componentes multimodais do contexto B ao EC. Por consequência, quando o animal foi retomado ao contexto A no dia do TT, o mesmo não conseguiu evocar a informação aprendida no TR de forma adequada, por não ter dissociado o contexto B do som. Assim, acreditamos que para o WAR, o EC no TT seja interpretado como irrelevante/incompleto por ser apresentado separadamente dos componentes que fazem parte do contexto B. Logo, o mesmo manifestou no dia do TT comportamento e PEArp semelhantes ao PT, não demonstrando relevância ao EC.

Outra forma de explicarmos o não aprendizado do WAR na tarefa de condicionamento ao medo auditivo seria pelo fato de que o WAR possuiria um dano morfológico ou funcional no AMY. Entretanto esta hipótese não se aplica, baseado no

fato de que o WAR foi capaz de associar a representação contextual com o ENC – tarefa sabidamente AMY-dependente (Phillips, 1992).

Portanto, acreditamos que no condicionamento ao medo contextual a hiperativação encontrada no AMY do WAR beneficiou o aprendizado associativo, uma vez que o TT de retenção foi realizado no mesmo contexto onde ocorreu o TR. Ainda, vale a pena ressaltar que a representação contextual nesta tarefa é consequente da organização unificada de estímulos estáveis provenientes de modalidades sensoriais múltiplas e principalmente, independentes de aferências auditivas (Muller, 1987; Zhang, 2015; Gener, 2013). Logo, sugerimos que este fator também beneficiou o aprendizado adequado nesta tarefa.

Os resultados encontrados com o WAR no teste de condicionamento ao medo contextual corroboram com os dados encontrados no condicionamento instrumental ativo e passivo (Castro, 2015). Os autores descreveram que no teste de esquiva ativa de duas vias (*Two-way active avoidance - TWAA*) os animais apresentaram um número menor de respostas condicionadas, ou seja, se movimentaram menos para o outro compartimento da caixa. Neste caso, o WAR apresentou um desempenho inadequado nesta tarefa, sugerindo ter havido um comprometimento do aprendizado e/ou não retenção da memória associativa. Entretanto, de forma intrigante, no teste de esquiva inibitória (*Step-down inhibitory avoidance- TDIA*) os animais apresentaram um número maior de resposta condicionada, definida pela maior latência para descer da plataforma de madeira. Neste caso, os animais apresentaram um aprendizado adequado nesta tarefa, equiparando-se ao grupo controle.

Contudo, essa ambiguidade de resultados deve ser interpretada com cautela, uma vez que nos dois testes, o WAR apresentou um índice de congelamento elevado (Castro, 2015). Uma possível explicação para este resultado seria o fato de que o WAR possui um

déficit motor que prejudicaria sua locomoção. Entretanto, essa explicação é improvável, visto que o WAR não apresentou déficit sensório-motor, de locomoção espontânea ou coordenação motora neste trabalho (Figuras 09 – 11).

De fato, acreditamos que o desempenho do WAR nos condicionamentos operantes (TWAA e STIA) também teria sofrido interferências pela facilitação do AMY, assim como ocorreu nos condicionamentos clássico e contextual.

Sabe-se que o córtex pre-frontal medial (mCPF) vem sendo indicado na literatura como um substrato importante para mediar as respostas instrumentais no condicionamento de esquiva ativa (Moscarello, 2013; Moscarello, 2017) e passiva (Canto-de-Souza, 2016; Yang, 2013; Zhang, 2011). Ainda, sabe-se que a transição do comportamento de RC passivas (congelamento) para RC ativas (fuga) que ocorre no condicionamento instrumental depende da modulação do CeA (Fadok, 2017), mediada pelo mCPF (Moscarello, 2013; Milad, 2002; Quirk, 2003; Likhtik, 2005). Uma vez que o AMY do WAR possui uma maior hiperexcitabilidade, sugerimos que a modulação realizada pelo mCPF no CeA é inexistente ou ao menos insuficiente, impedindo a manifestação das RC ativas durante o condicionamento operante.

Por fim, podemos sugerir com base nos resultados da tarefa de RON que o WAR é capaz de apresentar a memória de reconhecimento de forma adequada, equiparando-se ao grupo controle. Além disso, este resultado pode sugerir que além do WAR apresentar o comportamento exploratório inato de roedores preservado (Baxter, 2010; Ennaceur, 1988), o hipocampo (substrato chave para realização desta tarefa) (Broadbent, 2009; Cohen, 2013) encontra-se intacto. Estes achados corroboram com o resultado do condicionamento ao medo contextual, o qual também depende do hipocampo para realizar a representação contextual de forma adequada (Phillips, 1992; Suzuki, 2004).

7. CONCLUSÃO

Podemos sugerir com base nos resultados demonstrados neste trabalho que o WAR apresenta uma facilitação na via acústica, semelhante a hiperativação límbica previamente demonstrada em outros trabalhos. Ainda, podemos sugerir que esta facilitação acústico-límbica pode comprometer (condicionamento ao medo auditivo) ou beneficiar (condicionamento contextual) os processos mnemônicos, dependendo da circuitaria utilizada para modulação do aprendizado.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDENKAMP, A.P. **Cognitive impairment in epilepsy: State of affairs and clinical relevance.** *Seizure*, 15, 219-220. (2006).
- ALMEIDA-SANTOS, A.F.; MOREIRA, F.A.; GUIMARÃES, F.S.; AGUIAR, D.C. **Role of TRPV1 receptors on panic-like behaviors mediated by the dorsolateral periaqueductal gray in rats.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* (2013).
- AMORAPANTH, P.; LEDOUX, J.E.; NADER, K. **Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus.** *Nature* (2000).
- BAJO, V.M.; KING, A.J. **Cortical modulation of auditory processing in the midbrain.** *Frontiers in neural circuits*. Volume 6. Article 114. (2013).
- BATTAGLIA, F.P.; BENCHENANE, K.; SIROTA, A.; PENNARTZ, C.M.; WIENER, S.I. **The hippocampus: hub of brain network communication for memory.** *Trends Cogn. Sci.* 15, 310–318 (2011).
- BAXTER, M.G. **“I’ve seen it all before”: explaining age-related impairments in object recognition.** Theoretical Comment on Burke et al. (2010). *Behav Neurosci* 124:706–709 (2010).
- BEAR, M.F.; MALENKA, R.C. **Synaptic plasticity: LTP and LTD.** *Current opinion in neurobiology* 4:389-399 (1994).
- BECHARA, A.; DAMASIO, H.; DAMASIO, A.R. **Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex.** *Cereb Cortex*, v. 10, n. 3, p. 295-307, Mar (2000).
- BEENHAKKER, M.P.; HUGUENARD, J.R. **Neurons that fire together also conspire together: is normal sleep circuitry hijacked to generate epilepsy?** *Neuron*. June 11; 62(5): 612–632. (2009).
- BERTTI, P.; TEJADA, J.; MARTINS, A.P.P.; DAL-COI, M.L.C.; TERRA, V.C.; OLIVEIRA, J.A.C.; VELASCO, T.N.; SAKAMOTO, A.C.; GARCIA-CAIRASCO, N. **Looking for complexity in quantitative semiology of frontal and temporal lobe seizures using neuroethology and graph theory.** *Epilepsy and behavior*. 38. 81-93 (2014).
- BEVINS, R.A. **One-trial context fear conditioning as a function of the interstimulus interval.** Faculty Publications, Department of Psychology. 93. (1995).
- BLAIR, H.T.; SCHAFE, G.E.; BAUER, E.P. **Synaptic Plasticity in the Lateral Amygdala: A Cellular Hypothesis of fear conditioning.** *Learn. Mem.* 2001 8: 229-242 (2001).
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. **Crouching as an index of fear.** *Journal of comparative and physiological psychology*, 67(3), 370-375. (1969).
- BLANCHARD R.J.; BLANCHARD, D.C.; AGULLANA, R.; WEISS, S.M. **Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems.** *Physiol Behav.* 1991 Nov;50(5):967-72 (1991).
- BRENNER, C. A. K., G. P.; VOHS, J. L.; AHN, W. Y.; HETRICK, W. P.; MORZORATI, S. L.; O’DONNELL, B. F. **Steady State Responses: Electrophysiological Assessment of Sensory Function in Schizophrenia.** *Schizophrenia Bulletin*, v. 35, n. 6, 2009
- BROADBENT, N.J.; GASKIN, S.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. **Object recognition memory and the rodent hippocampus.** *Learning & Memory* (2009).
- BROMLEY, R.L.; LEEMAN, B.A.; BAKER, G.A.; MEADOR, K.J. **Cognitive and neurodevelopmental effects of antiepileptic drugs.** *Epilepsy Behav* 2011;22:9-16. (2011).

BURSTEIN, R.; POTREBIC, S. **Retrograde Labeling of Neurons in the Spinal Cord That Project Directly to the Amygdala or the Orbital Cortex in the Rat.** THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 335:469-485 (1993).

BUTLER, C.R.; ZEMAN, A.Z. **Recent insights into the impairment of memory in epilepsy: transient epileptic amnesia, accelerated long-term forgetting and remote memory impairment.** Brain (2008), 131, 2243-2263. (2008).

BUZSAKI, G. **Rhythms of the brain.** Oxford University Press, Inc. (2006).

BUZSÁKI, G. **Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states.** Neuroscience 31, 551–570 (1989).

CALFORD, M. **Ascending projections to the medial geniculate body of the cat: evidence for multiple, parallel auditory pathways through thalamus.** The Journal of Neuroscience, v. 3, n. 11, (1983).

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

CANTO-DE-SOUZA, L.; MATTIOLI, R. **The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex.** Neurobiology of Learning and Memory (2016).

CARDAMONE, L.; SALZBERG, M.; O'BRIEN, T.; JONES, N. **Antidepressant therapy in epilepsy: can treating the comorbidities affect the underlying disorder?** J Pharmacol 2013;168:1531-54. (2013)

CASTRO, G.P.; MEDEIROS, D.C.; GUARNIERI, L.O.; MOURÃO, F.A.G.; PINTO, H.P.P.; PEREIRA, G.S.; MORAES, M.F.D. **Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility.** Epilepsy and Behavior. (2015).

CELLINI, N. **Memory Consolidation in Sleep Disorders.** Sleep Medicine Reviews (2016), doi: 10.1016/j.smrv.2016.09.003. (2016).

CHURCHWELL, J.C.; MORRIS, A.M.; MUSSO, N.D.; KESNER, R.P. **Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory.** Neurobiol. Learn. Mem. 93, 415–421 (2010).

COBAR, L.F.; YUAN, L.; TASHIRO, A. **Place cells and long-term potentiation in the hippocampus.** Neurobiology of Learning and Memory (2016).

COHEN, S.J.; MUNCHOW, A.H.; RIOS, L.S.; ZHANG, G.; ÁSGEIRSDÓTTIR, H.N.; STACKMAN, R.W. **The rodent hippocampus is essential for non-spatial object memory.** Published in final edited form as: Curr Biol. 2013 September 9; 23(17): 1685–1690 (2013).

COLGIN, L.L. **Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony.** Curr. Opin. Neurobiol. 21, 467–474 (2011).

COLLINS, D.R.; PARE, D. **Differential Fear Conditioning Induces Reciprocal Changes in the Sensory Responses of Lateral Amygdala Neurons to the CS+ and CS-.** LEARNING & MEMORY 7:97–103 (2000).

DAVIS, M. **Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm.** Behav Neurosci. 1986 Dec;100(6):814-24 (1986).

DAVIS, H. **Principles of electric response audiometry.** Ann Otol Rhinol Laryngol, v. 28, n. 3, p. 1-96, 1976.

DAWSON, G. D. **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.

DAWSON, G.D. **A summation technique for detecting small signals in a large irregular background.** *J Physiol*, v. 115, n. 1, 1951.

DIEKELMANN, S.; BORN, J. **The memory function of sleep.** *Nature reviews*. Volume 11. (2010).

DORETTO, M.C.; FONSECA, C.G.; LÔBO, R.B.; TERRA, V.C.; OLIVEIRA, J.A.; GARCIA-CAIRASCO, N. **Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR).** *Behav Genet*. 2003;33(1):33–42. (2003).

DRUMOND, L.E.; KUSHMERICK, C.; GUIDINE, P.A.M.; DORETTO, M.C.; MORAES, M.F.D.; MASSENSINI, A.R. **Reduced hippocampal GABAergic function in Wistar audiogenic rats.** *Braz J Med Biol Res*, October 2011, Volume 44(10) 1054-1059 (2011).

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. **A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats.** *Behavioral data. Behav Brain Res* 31:47–59 (1988).

FADOK, J.P.; KRABBE, S.; MARKOVIC, M.; COURTIN, J.; XU, C.; MASSI, L.; BOTTA, P.; BYLUND, K.; MÜLLER, C.; KOVACEVIC, A.; TOVOTE, P.; LÜTHI, A. **A competitive inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses.** *Nature*. Volume 542. (2017).

FAINGOLD, D.N. **Differential Roles in the Neuronal Network for Audiogenic Seizures Are Observed among the Inferior Colliculus Subnuclei and the Amygdala.** *Experimental Neurology*, v. 157, p. 135-141. (1999).

FANSELOW, M.S. **What is conditioned fear?** *Trends in neurosciences*. Volume 7, Issue 12, 460-462. (1984).

FANSELOW, M.S.; LEDOUX, J.E. **Why We Think Plasticity Underlying Pavlovian Fear Conditioning Occurs in the Basolateral Amygdala.** *Neuron*, Vol. 23, 229–232, June (1999).

FANSELOW, M.S. **Conditional and Unconditional Components of Post-Shock Freezing.** *Pav. J. Biol. Sci.* (1980).

FANSELOW, M.S. **Associative vs Topographical Accounts of the immediate Shock-Freezing Deficit in Rats: Implications for the Response Selection Rules Governing Species-Specific Defensive Reactions.** *Learning and motivation* 17, 16-39 (1986).

FANSELOW, M.S. **From contextual fear to a dynamic view of memory systems.** *Trends in Cognitive Sciences* Vol.14 No.1 (2010).

FANSELOW, M.S. **Factors governing one-trial contextual conditioning.** *Animal Learning & Behavior* 1990, 18 (3), 264-270 (1990).

FANSELOW, M.S. **Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear.** *Psychonomic Bulletin & Review* 1994, 1 (4), 429-438 (1994).

FELIX, L. B. et al. **Post-processing of auditory steady-state responses to correct spectral leakage.** *J Neurosci Methods*, v. 181, n. 1, p. 145-9, Jun 30 2009. ISSN 1872-678X

FENDT, M.; FANSELOW, M.S. **The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear.** *Neurosci Biobehav Rev*. 1999 May;23(5):743-60. (1999).

FISHER, R.S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLOU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J.H.; ELGER, C.E.; ENGEL, J. **A practical clinical definition of epilepsy.** *Epilepsia*, 55(4):475–482, (2014).

FISHER, R.S.; BOAS, W.E.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. **Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International league against epilepsy (ILAE) and the International Bureau for epilepsy (IBE).** *Epilepsia*, 46(4); 470-472. (2005).

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).

FONSECA, C.S.; GUSMÃO, I.D.; RASLAN, A.C.S.; MONTEIRO, B.M.M.; MASSENSINI, A.R.; MORAES, M.F.D.; PEREIRA, G.S. **Object recognition memory and temporal lobe activation after delayed estrogen replacement therapy.** *Neurobiology of Learning and Memory* Volume 101, March 2013, Pages 19-25 (2013).

FRAKEL, W.N. **Genetics of complex neurological disease: Challenges and opportunities for modeling epilepsy in mice and rats.** *Trends Genet.* 2009 August ; 25(8): 361–367. doi:10.1016/j.tig.2009.07.001 (2009).

GALAMBOS, R. M., S.; TALMACHOFF, P. J. **A 40-Hz auditory potential recorded from the human scalp.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 78, n. 4, (1981).

GALE, G.D.; ANAGNOSTARAS, S.G.; GODSIL, B.P.; MITCHELL, S.; NOZAWA, T.; SAGE, J.R.; WILTGEN, B.; FANSELOW, M.S. **Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats.** *J Neurosci.* 2004 Apr 14;24(15):3810-5. (2004).

GARCIA-CAIRASCO, N. **A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures.** *Hearing Research* 168. 208-222 (2002).

GARCIA-CAIRASCO, N.; TERRA, V.C.; DORETTO, M.C. **Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats.** *Behavioural Brain Research*, 58. 57-67 (1993).

GARCIA-CAIRASCO, N.; UMEOKA, L.H.L.; OLIVEIRA, J.A.C. **The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives.** *Epilepsy & Behavior.* (2017).

GARCIA-CAIRASCO, N.; OLIVEIRA, J.A.C.; WAKAMATSU, H.; BUENO, S.T.B.; GUIMARAES, F.S. **Reduced Exploratory Activity of Audiogenic Seizures Susceptible Wistar Rats.** *Physiology & Behavior*, Vol. 64, No. 5, pp. 671–674, (1998).

GARCIA-CAIRASCO, N. W., H.; OLIVEIRA, A. C.; GOMES, E. L. T.; DEL BEL, E. A. AND MELLO. **Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats.** *Epilepsy Res*, v. 26, p. 177-192, (1996).

GELINAS, J.N.; KHODAGHOLY, D.; THESEN, T.; DEVINSKY, O.; BUZSÁKI, G. **Interictal epileptiform discharges induce hippocampal–cortical coupling in temporal lobe epilepsy.** *Nature.* (2016).

GENER, T.; PEREZ-MENDEZ, L.; SANCHEZ-VIVES, M.V. **Tactile Modulation of Hippocampal Place Fields.** *HIPPOCAMPUS* 23:1453–1462 (2013).

GIOVAGNOLI, A.R.; AVANZINI, G. **Learning and Memory Impairment in Patients with Temporal Lobe Epilepsy: Relation to the Presence, Type, and Location of Brain Lesion.** *Epilepsia*, 40(7):904-911 (1999).

GIRARDEAU, G.; BENCHENANE, K.; WIENER, S.I.; BUZSÁKI, G.; ZUGARO, M.B. **Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory.** *Nat. Neurosci.* 12, 1222–1223 (2009).

GREENER, M. **Beyond seizures: understanding cognitive deficits in epilepsy.** *Epilepsy and cognition.* June (2013).

GRUTERS, K.G.; GROH, J. M. **Sounds and beyond: multisensory and other non-auditory signals in the inferior colliculus.** *Frontiers in Neural Circuits*, v. 6, 2012-December-11 2012. ISSN 1662-5110 (2012).

GUZMAN, P.; D'ANTUONO, M.; AVOLI, M. **Initiation of electrographic seizures by neuronal networks in entorhinal and perirhinal cortices in vitro.** *Neuroscience*, v. 123, n. 4, p. 875-886, // ISSN 0306-4522. (2004).

GUZMAN, P.H.; NAZER, F.; DICKSON, C.T. **Short-duration epileptic discharges show a distinct phase preference during ongoing hippocampal slow oscillations.** *J. Neurophysiol.* 104, 2194–2202 (2010).

HAN, Y.; AN, B.; CHOI, S. **Enhanced theta synchronization correlates with the successful retrieval of trace fear memory.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2016).

HERMANN, B.; SEIDENBERG, M. **Epilepsy and cognition.** *Epilepsy Currents*, Vol. 7, No. 1(January/February) 2007 pp. 1–6. (2007).

HIRSCH, E.; DANOBER, L.; SIMLER, S.; PEREIRA DE VASCONCELOS, A.; MATON, B.; NEHLIG, A.; MARESCAUX, C.; VERGNES, M. **The amygdala is critical for seizure propagation from brainstem to forebrain.** *Neuroscience* Vol. 77, No. 4, pp. 975–984. (1997).

HIRSCH, E.; MATON, B.; VERGNES, M.; DEPAULIS, A.; MARESCAUX, C. **Positive transfer of audiogenic kindling to electrical hippocampal kindling in rats.** *Epilepsy research*, 11 159-166. (1992).

HOPPE, C.; ELGER, C.E.; HELMSTAEDTER, C. **Long-term memory impairment in patients with focal epilepsy.** *Epilepsia*, 48(Suppl. 9):26–29 (2007).

HUANG, Y.; LI, X.; KANDEL, E.R. **CAMP Contributes to Mossy Fiber LTP by Initiating Both a Covalently Mediated Early Phase and Macromolecular Synthesis-Dependent Late Phase.** *Cell*, Vol. 79, 69-79, October 7, 1994, Copyright © 1994 by Cell Press (1994).

IJFF, D.M.; ALDENKAMP, A.P. **Cognitive side-effects of antiepileptic drugs in children.** *Handb Clin Neurol* 2013;111:707-18. (2013).

IMAMURA, S.-I. et al. **Hippocampal transection attenuates kainic acid-induced amygdalar seizures in rats.** *Brain Research*, v. 897, n. 1–2, p. 93-103, 4/6/ ISSN 0006-8993. (2001).

IZQUIERDO, I. **Memória.** *Estud. av.* vol.3 no.6 São Paulo May/Aug. (1989).

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).

JADHAV, S.P.; KEMERE, C.; GERMAN, P.W.; FRANK, L.M. **Awake hippocampal sharp-wave ripples support spatial memory.** *Science* 336, 1454–1458 (2012).

JAMBAQUE, I.; DELLATOLAS, G.; DULAC, O.; PONSOT, G.; SIGNORET, J. **Verbal and visual memory impairment in children with epilepsy.** *Neuropsychologia*, Vol 31, No 12, pp1321-1337 (1993).

JAY, T.M.; BURETTE, F.; LAROCHE, S. **NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in the rat.** *Eur. J. Neurosci.* 7, 247–250 (1995).

JAY, T.M.; WITTER, M.P. **Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin.** *J. Comp. Neurol.* 313, 574–586 (1991).

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* 102: 941–952 (2009).

JOBE, P.C.; PICCHIONI, A.L.; CHIN, L. **Role of brain norepinephrine in audiogenic seizure in the rat.** *J Pharmacol Exp Ther.* 1973;184(1):1–10. (1973).

- JOHNSON, L.A.; EUSTON, D.R.; TATSUNO, M.; MCNAUGHTON, B.L. **Stored-trace reactivation in rat prefrontal cortex is correlated with down-to-up state fluctuation density.** *J. Neurosci.* 30, 2650–2661 (2010).
- JOKEIT, H.; DAAMEN, M.; ZANG, H.; JANSZKY, J.; EBNER, A. **Seizures accelerate forgetting in patients with left-sided temporal lobe epilepsy.** *Neurology* 57; 125-126 (2001).
- JUNG, M.W.; MCNAUGHTON, B.L. **Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer.** *Hippocampus* 3, 165-182. (1993).
- KANDEL, E.R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M.R. **The Molecular and Systems Biology of Memory.** *Cell* 157, March 27, 2014 *2014 Elsevier (2014).
- KAPP, B.S.; FRYSSINGER, R.C.; GALLAGHER, M.; HASELTON, J.R. **Amygdala Central Nucleus Lesions: Effect on Heart Rate Conditioning in the Rabbit.** *Physiology & Behavior*, Vol. 23, pp. 1109-1117. (1979).
- KIESMANN, M.; MARESCAUX, C.; VERGNES, M.; MICHELETTI, G.; DEPAULIS, A.; WARTER, J.M. **Audiogenic seizures in Wistar rats before and after repeated auditory stimuli: clinical, pharmacological, and electroencephalographic studies.** *J Neural Transm.* 1988;72(3):235–244. (1988).
- KIM,E.; KO, T. **Cognitive impairment in childhood onset epilepsy: up-to-date information about its causes.** *Korean J Pediatr* 2016;59(4):155-164. (2016).
- KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. **Modality-Specific Retrograde Amnesia of Fear.** *Science*, Volume 256. (1992).
- KNAPSKA, E.; MAREN, S. **Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear.** *Learn Mem*, v. 16, n. 8, p. 486-93, Aug 2009
- KRISHNAN, G. P. et al. **Steady state and induced auditory gamma deficits in schizophrenia.** *NeuroImage*, v. 47, n. 4, p. 1711-1719, 10/1/ 2009
- KRUSHINSKY, V.L. **News in investigations of experimental epilepsy.** *Usp Sovrem Biol.* 1949;28:108–133 (1949).
- KUDO, M.; NIMI, K. **Ascending projections of the inferior colliculus in the cat: an autoradiographic study.** 191, v. 4, (1980).
- KUWADA, S.; BATRA, R.; MAHER, V. L. **Scalp potentials of normal and hearing-impaired subjects in response to sinusoidally amplitude-modulated tones.** *Hearing Research*, v. 21, n. 2, p. 179-192, // 1986
- LEDOUX, J.E. **Fear pathways in the brain: Implications for a theory of the emotional brain.** In P. F. Brain, S. Parmigiani, R. J. Blanchard, & D. Mainardi (Eds.), *Ettore Majorana international life sciences series*, Vol. 8. Fear and defence (pp. 163-177). (1990).
- LEDOUX, J.E.; FARB,C.; RUGGIERO, D.A. **Topographic Organization of Neurons in the Acoustic Thalamus That project to the amygdala.** *The Journal of Neuroscience*, April 1990, fO(4): 1043-1 054 (1990b).
- LEDOUX, J.E. **The emotional brain.** Simon and Schuster. (1996).
- LEDOUX, J.E. **Emotion circuits in the brain.** *Annu. Rev. Neurosci.* 2000. 23:155–184 (2000).
- LEDOUX, J.E.; RUGGIERO, D.A.; FOREST, R.; STORNETA, R.; REIS, D.J. **Topographic Organization of Convergent Projections to the Thalamus From the Inferior Colliculus and Spinal Cord in the Rat.** *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* 264~123-146 (1987).

LEDOUX, J.E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, J.R. **Different Projections of the Central Amygdaloid Nucleus Mediate Autonomic and Behavioral Correlates of Conditioned Fear.** The Journal of Neuroscience, July 1988, 8(7): 2517-2529 (1988).

LEE, T.; KIM, J.J. **Differential effects of cerebellar, amygdalar, and hippocampal lesions on classical eyeblink conditioning in rats.** J Neurosci. 2004 Mar 31;24(13):3242-50 (2004).

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência.** Atheneu. 2ª edição. (2010).

LEUNG, L.-W. Field Potentials in the Central Nervous System. In: BOULTON, A.; BAKER, G., *et al* (Ed.). Neurophysiological Techniques: Humana Press, v.15, 1990. cap. 4, p.277-312. (Neuromethods). ISBN 978-0-89603-185-2 (1990).

LEUTGEB, S.; LEUTGEB, J.K.; TREVES, A.; MOSER, M.B.; MOSER, E.I. **Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1.** Science 305, 1295-1298. (2004).

LIKHTIK, E.; PELLETIER, J.G.; PAZ, R.; PARE, D. **Prefrontal Control of the Amygdala.** The Journal of Neuroscience, August 10, 2005 • 25(32):7429–7437 (2005).

LOCKMANN, A.L.V.; MOURÃO, F.A.G.; MORAES, M.F.D. **Auditory fear conditioning modifies steady-state evoked response in the inferior colliculus.** J Neurophysiology (2017).

LOGOTHETIS, N. K. **The underpinnings of the BOLD functional magnetic resonance imaging signal.** J Neurosci, v. 23, n. 10, (2003).

LOPIM, G.M.; CAMPOS, D.V.; SILVA, S.G.; ALMEIDA, A.A. LENT, R.; CAVALHEIRO, E.A.; ARIDA, R.M. **Relationship between seizure frequency and number of neuronal and non-neuronal cells in the hippocampus throughout the life of rats with epilepsy.** Brain research. 1634 179-186 (2016).

MAGALHÃES, L.H.M.; GARCIA-CAIRASCO, N.; MASSENSINI, A.R.; DORETTO, M.C.; MORAES, M.F.D. **Evidence for augmented brainstem activated forebrain seizures in Wistar Audiogenic Rats subjected to transauricular electroshock.** Neuroscience Letters 369 (2004) 19–23 (2004).

MAHONEY, W.J.; AYRES, J.J.B. **One-trial simultaneous and backward fear conditioning as reflected in conditioned suppression of licking in rats.** Animal Learning & Behavior 1976. Vol. 4 (4), 357-362 (1976).

MALHEIROS, J.M.; LONGO, B.M.; TANNUS, A.; COVOLAN, L. **Imagens contrastadas por manganês na fase aguda da epilepsia induzida por pilocarpina.** Einstein 10 (2): 247-52 (2012).

MAREN, S. **Neurobiology of pavlovian fear conditioning.** Annu. Rev. Neurosci. 2001. 24:897–931 (2001).

MAREN, S.; AHARONOV, G.; STOTE, D.L.; FANSELOW, M.S. **N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats.** Behav Neurosci. 1996 Dec;110(6):1365-74. (1996).

MARESCAUX, C.; VERGNES, M.; KIESMANN, M.; DEPAULIS, A.; MICHELETTI, G.; WARTER, J.M. **Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study.** Exp Neurol. 1987;97(1):160–168. (1987).

MARK, R.G.; HALL, R.D. **Acoustically evoked potentials in the rat during conditioning.** J Neurophysiol 30: 875-892 (1967).

MASCAGNI, F.; MCDONALD, A.J.; COLEMAN, J.R. **Corticoamygdaloid and corticocortical projections of the rat temporal cortex: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin study.** Neuroscience Vol. 57, k 3, pp. 697-715 (1993).

MCALLISTER, W.R.; MCALLISTER, D.E. **Behavioral Measurement of Conditioned Fear**. In *Aversive Conditioning and Learning*, edited by F. ROBERT BRUSH, Academic Press, 1971, Pages 105-179 (1971).

MCDONALD, A.J. **Cortical pathways to the mammalian amygdala**. *Progress in Neurobiology* Vol. 55, pp. 257 to 332 (1998).

MILAD, M.R.; VIDAL-GONZALEZ, I.; QUIRK, G.J. **Electrical Stimulation of Medial Prefrontal Cortex Reduces Conditioned Fear in a Temporally Specific Manner**. *Behavioral Neuroscience*, Vol. 118, No. 2, 389–394 (2004).

MILAD, M.R.; QUIRK, G.J. **Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction**. *Nature*. Volume 420. (2002).

MILLER, L.A.; GALIOTO, R.; TREMONT, G.; DAVIS, J.; BRYANT, K.; ROTH, J.; LAFRANCE, W.C.; BLUM, A.S. **Cognitive impairment in older adults with epilepsy: Characterization and risk factor analysis**. *Epilepsy & Behavior*. 56, 113-117. (2016).

MISERENDINO, M.J.; SANANES, C.B.; MELIA, K.R.; DAVIS, M. **Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala**. *Nature*. 1990 Jun 21;345(6277):716-8. (1990).

MITZDORF, U. **Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena**. 1985. 37-100 (1985).

MORAES, M. F. D.; VECCHIO, F. D.; TERRA, V. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. **Time evolution of acoustic information processing in the mesencephalon of wistar rats**. *Neuroscience Letters* v. 284, p. 13-16, (2000b).

MORAES, M.F.D.; GALVIS-ALONSO, O.Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. **Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures**. *Epilepsy & Research*. 39. 251-259 (2000).

MORGAN, M.; LEDOUX, J.E. **Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats**. *Behavioral Neuroscience*, 109(4), 681-688. (1995).

MORGAN, M.; SCHULKIN, J.; LEDOUX, J.E. **Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: the memory for prior extinction training**. *Behavioural Brain Research* 146 (2003) 121–130 (2003).

MOSCARELLO, J.M.; LEDOUX, J.E. **Active Avoidance Learning Requires Prefrontal Suppression of Amygdala-Mediated Defensive Reactions**. *The Journal of Neuroscience*, February 27, 2013 • 33(9):3815–3823 (2013).

MOSCARELLO, J.M.; MAREN, S. **Flexibility in the face of fear: hippocampal–prefrontal regulation of fear and avoidance**. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 2018, 19:44–49 (2017).

MULLER, J.; CORODIMAS, K.P.; FRIDEL, Z.; LEDOUX, J.E. **Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli**. *Behav Neurosci*. 1997 Aug;111(4):683-91. (1997).

MULLER, R.U.; KUBIE, J.L. **The Effects of Changes in the Environment on the Spatial Firing of Hippocampal Complex-Spike Cells**. *The Journal of Neuroscience*, July 1987, 7(7): 1951-1988 (1987).

MURAWSKI, N.J.; ASOK, A. **Understanding the contributions of visual stimuli to contextual fear conditioning: A proof-of-concept study using LCD screens**. *Neuroscience letters*. (2016).

NADER, N.; MAJIDISHAD, P.; AMORAPANTH, P.; LEDOUX, J.E. **Damage to the Lateral and Central, but Not Other, Amygdaloid Nuclei Prevents the Acquisition of Auditory Fear Conditioning**. *LEARNING & MEMORY* 8:156–163 © 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory. (2001).

NIEDERMEYER, E. S., F. L. **Electroencephalography. Basic Principles, Clinical applications and Related Fields.** Book, v. 5, (2005).

O'KEEFE, J. **The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat.** Brain Research, 34 (1971) 171-175 (1971).

O'KEEFE, J.; SPEAKMAN, A. **Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task.** Exp Brain Res (1987) 68:1-27 (1987).

OLIVER, D.L.K.; YIN, T.C.; HABERLY, L.B.; HENKEL, C. **Dendritic and axonal morphology of HRP-injected neurons in the inferior colliculus of the cat.** J Comp Neurol. v. 303, n. 1, (1991).

PAPE, H.S.; PARE, D. **Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear.** Physiol Rev. 2010 April ; 90(2): 419–463 (2010).

PARÉ, D. **Intrinsic circuitry of the amygdaloid complex: common principles of organization in rats and cats.** TINS Vol. 21, No. 6 (1998).

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 6th. Amsterdam; Oxford: Elsevier Academic, 2007.

PENFIELD, W; JASPER, H. **Epilepsy and the Functional Anatomy of the Human Brain.** Little, Brown, Boston, (1954).

PETERSON, L.R. **Short-term memory.** Scientific American. Vol. 215, No. 1 (July 1966), pp. 90-95. (1966).

PEYRACHE, A.; BATTAGLIA, F.P.; DESTEXHE, A. **Inhibition recruitment in prefrontal cortex during sleep spindles and gating of hippocampal inputs.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 17207–17212 (2011).

PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. **Differential Contribution of Amygdala and Hippocampus to Cued and Contextual Fear Conditioning.** Behavioral Neuroscience 1992, Vol. 106. No. 2. 274-285 (1992).

PICTON, T., W.; JOHN, M, S.; DIMITRIJEVIC, A.; PURCELL, D. **Human auditory steady-state responses.** Int J Audiol., 2003.

PICTON, T. W. H., S. A.; KRAUSZ, H. I; GALAMBOS, R. **Human auditory evoked potentials. I. Evaluation of components.** Electroencephalogr Clin Neurophysiol., 1974.

PICTON, T. W. S., C. R.; CHAMPAGNE, S. C.; KELLETT, A. J.; MAISTE, A. C. **Potentials evoked by the sinusoidal modulation of the amplitude or frequency of a tone.** J Acoust Soc Am., 1987

PINTO, H.P.P.; CARVALHO, V.R.; MEDEIROS, D.C.; ALMEIDA, A.F.S.; MENDES, E.M.A.M.; MORAES, M.F.D. **Auditory processing assessment suggests that wistar audiogenic rat neural networks are prone to entrainment.** Neuroscience. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.043. (2017).

PITKÄNEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J.E. **Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala.** Trends Neurosci. (1997) 20, 517–523 (1997).

POULOS, A.M.; THOMPSON, R.F. **Localization and characterization of an essential associative memory trace in the mammalian brain.** Brain research. (2015).

QUIRK, G.J.; REPA, C.; LEDOUX, J.E. **Fear Conditioning Enhances Short-Latency Auditory Responses of Lateral Amygdala Neurons: Parallel Recordings in the Freely Behaving Rat.** Neuron, Vol. 15, 1029-1039, November (1995).

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*, Vol. 19, 613–624, September (1997).

QUIRK, G.J.; LIKHTIK, E.; PELLETIER, J.G.; PARE, D. **Stimulation of Medial Prefrontal Cortex Decreases the Responsiveness of Central Amygdala Output Neurons.** *The Journal of Neuroscience*, September 24, 2003 • 23(25):8800–8807 (2003).

QUIRK, G.J.; MULLER, R.U.; KUBIE, J.L. **The Firing of Hippocampal Place Cells in the Dark Depends on the Rat's Recent Experience.** *The Journal of Neuroscience*, June 1990, X7(6): 2008-2017 (1990).

RACINE, R.J. **Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure.** *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, v. 32, n. 3, p. 281-294, 3// 1972. ISSN 0013-4694.

RASS, O. **Auditory steady state response in the schizophrenia, first-degree relatives, and schizotypal personality disorder.** *Schizophr Res*, v. 136, n. 1-3, p. 143-9, Apr 2012

RASHID, H.; MAHBOOB, A.; AHMED, T. **Role of Cholinergic Receptors in Memory Retrieval Depends on Gender and Age of Memory.** *Behavioural Brain Research* (2017).

REES, A.; GREEN, G. G. R.; KAY, R. H. **Steady-state evoked responses to sinusoidally amplitude-modulated sounds recorded in man.** *Hearing Research*, v. 23, n. 2, p. 123-133, 1986

REGAN, D. **Human Brain Electrophysiology: Evoked Potentials and Evoked Magnetic Fields in Science and Medicine.** Elsevier, v. 672, 1989.

REPA, J.C.; MULLER, J.; APERGIS, J.; DESROCHERS, T.M.; ZHOU, Y.; LEDOUX, J.E. **Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory.** *Nature* (2001).

RESCORLA, R.A. **Probability of shock in the presence and absence of CS in fear conditioning.** *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 1968, Vol. 66, No. 1, 1-5 (1968).

RESCORLA, R.A. **Pavlovian conditioning and its proper control procedures.** *Psychol Rev.* 1967 Jan;74(1):71-80. (1967).

RIJCKEVORSEL, K. **Cognitive problems related to epilepsy syndromes, especially malignant epilepsies.** *Seizure*, 15, 227-234. (2006).

ROGAN, M.T.; STAUBLI, U.V.; LEDOUX, J.E. **Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala.** *Nature* 390, 604–607 (1997).

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.** *Cerebral Cortex* Nov/Dec 1993;3:515-532; 1047-3211/93/34.00 (1993).

ROMANSKI, L.M.; CLUGNET, M.C.; BORDI, F.; LEDOUX, J.E. **Somatosensory and Auditory Convergence in the Lateral Nucleus of the Amygdala.** *Behavioral Neuroscience* 1993. Vol. 107. No. 3, 444-450 (1993b).

ROSS, K.C.; COLEMAN, J.R. **Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates.** *Neurosci Biobehav Rev.* 2000;24(6):639–653. (2000).

ROY, D.S.; KITAMURA, T.; OKUYAMA, T.; OGAWA, S.K.; SUN, C.; OBATA, Y.; YOSHIKI, A.; TONEGAWA, S. **Distinct Neural Circuits for the Formation and Retrieval of Episodic Memories.** *Cell* 170, 1-13 (2017).

RUDY, J.W.; HUFF, N.C.; MATUS-AMAT, P. **Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28 (2004) 675–685 (2004).

- RUDY, J.W. **Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system.** *Learn. Mem.* 2009 16: 573-585 (2009).
- SARKISOVA, K.; LUIJTELAAR, G.V. **The WAG/Rij strain: A genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35 (2011) 854-876. (2011).
- SAVE, E.; CRESSANT, A.; THINUS-BLANC, C.; POU CET, B. **Spatial Firing of Hippocampal Place Cells in Blind Rats.** *The Journal of Neuroscience*, March 1, 1998, 18(5):1818–1826 (1998).
- SCARLATELLI-LIMA, A.V.M., L.H.M.; DORETTO, M.C.; MORAES, M.F.D. **A ssesment of the seizure susceptibility of Wistar Audiogenic rat to electroshock, pentylenerazole and pilocarpine.** *Brain Research*, v. 960, p. 184-189 (2003).
- SCHAFE, G.E.; DOYERE, V.; LEDOUX, J.E. **Tracking the Fear Engram: The Lateral Amygdala Is an Essential Locus of Fear Memory Storage.** *The Journal of Neuroscience*, October 26, 2005 • 25(43):10010–10015 (2005).
- SCHNEIDERMAN, N.; FRANCIS J.; SAMPSON L.D.; SCHWABER J.S. **CNS Integration of Learned Cardiovascular Behavior.** In: *Limbic and Autonomic Nervous Systems Research*. Springer, Boston, MA (1974).
- SCHWARCZ, R.; WITTER, M.P. **Memory impairment in temporal lobe epilepsy: the role of entorhinal lesions.** *Epilepsy Research* 50 (2002) 161–177. (2002).
- SCHREIJ, D.; THEEUWES, J.; OLIVERS, C. L. **Abrupt onsets capture attention independent of top-down control settings II: Additivity is no evidence for filtering.** *Attention, Perception, & Psychophysics*, v. 72, n. 3, p. 672-682, 2010
- SERIKAWA, T.; MASHIMO, T.; KURAMOTO, T.; VOIGT, B.; OHNO, Y.; SASA, M. **Advances on genetic rat models of epilepsy.** *Exp. Anim.* 64(1), 1–17 (2015).
- SHARMA, N.; JAMWAL, S.; KUMAR, P. **Beneficial effect of antidepressants against rotenone induced Parkinsonism like symptoms in rats.** *Pathophysiology* 23 123-134 (2016).
- SOLER-CEDENO, O.; CRUZ, E.; CRIADO-MARRENO, M.; PORTER, J.T. **Contextual fear conditioning depresses infralimbic excitability.** *Neurobiology of Learning and Memory* (2016).
- STIEDL, O.; SPIESS, J. **Effect of tone-dependent conditioning on heart rate and behavior of C57BL/6N mice.** *Behav. Neurosci.* 111:703-711 (1997).
- SUTHERLAND, R.J.; MCDONALD, R.J. **Hippocampus, amygdala, and memory deficits in rats.** *Behavioral Brain Research*, 37 (1990) 57-79 (1990).
- SUZUKI, W.A.; AMARAL, D.G. **Functional neuroanatomy of the medial temporal lobe memory system.** *Cortex*, (2004) 40, 220-222 (2004).
- TONEGAWA, S.; PIGNATELLI, M.; ROY, D.S.; RYAN, T.J. **Memory engram storage and retrieval. Current opinion in Neurobiology.** 35: 101-109 (2015).
- TSVETKOV, E.; CARLEZON, W.A.; BENES, F.M.; KANDEL, E.R.; BOLSHAKOV, V.Y. **Fear Conditioning Occludes LTP-Induced Presynaptic Enhancement of Synaptic Transmission in the Cortical Pathway to the Lateral Amygdala.** *Neuron*, Vol. 34, 289–300, April 11(2002).
- TURNER, B.H.; HERKNHAM, M. **Thalamoamygdaloid Projections in the Rat: A Test of the Amygdala's Role in Sensory Processing.** *The journal of comparative neurology* 313; 295-325 (1991).
- UHLHAAS, P.J.; SINGER, W. **Neural Synchrony in Brain Disorders: Relevance for Cognitive Dysfunctions and Pathophysiology.** *Neuron* 52, 155–168, Elsevier Inc. (2006).

- VAN DE KAR, L.D.; PIECHOWSKI, R.A.; RITTENHOUSE, P.A.; GRAY, T.S. **Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion.** *Neuroendocrinology*; 54, 89-95. (1991).
- VAN LUIJTELAAR, E.L.; COENEN, A.M. **Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats.** *Neurosci Lett.* 1986;70(3):393–397 (1986).
- VARELA, F; LACHAUX, J.P.; RODRIGUEZ, E.; MARTINERIE, J. **The brainweb: phase synchronization and large-scale integration.** *Nature reviews.* (2001).
- VEIZOVIC, T.; BEECH, J.S.; STROEMER, R.P.; WATSON, W.P.; HODGES, H. **Resolution of Stroke Deficits Following Contralateral Grafts of Conditionally Immortal Neuroepithelial Stem Cells.** (*Stroke.* 2001;32:1012-1019.) (2001).
- VILELA, L.R.; LIMA, I.V.; KUNSCHB, E.B.; PINTO, H.P.P.; MIRANDA, A.S.; VIEIRA, E.L.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; MORAES, M.F.D.; TEIXEIRA, A.L.; MOREIRA, F.A. **Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylenetetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels.** *Epilepsy & Behavior* 75. 29–35. (2017).
- WATSON, J.B.; RAYNER, R. **Conditioned Emotional Reactions.** *American psychologist.* Vol 55, No 3, 313-317. (1920).
- WECHSLER, D. **Engrams, memory storage, and mnemonic coding.** *American psychologist.* (1963).
- WEINBERGER, N.M. **Retuning the brain by fear conditioning.** In M. S. Gazzaniga (Ed.), *The cognitive neurosciences* (pp. 1071-1089). Cambridge, MA: The MIT Press. (1995).
- WENZEL, J.; SCHUSTER, T.; OTT, T.; KRUG, M. **Ultrastructural Changes in Neurons and Synapses of the Dentate Area Accompanying Long-term Potentiation Induced by Perforant Path Stimulation.** *Learning and memory.* Pergamon, 1986, Pages 109-114. (1986).
- WIGSTROM, H.; GUSTAFSSON, B.; HUANG, Y.; ABRAHAM, W.C. **Hippocampal long-term potentiation is induced by pairing single afferent volleys with intracellularly injected depolarizing current pulses.** *Acta Physiol Scand* 1986, 126, 3 I 7-3 19. (1986).
- WILENSKY, A.E.; SCHAFF, G.E.; KRISTENSEN, M.P.; LEDOUX, J.E. **Rethinking the Fear Circuit: The Central Nucleus of the Amygdala Is Required for the Acquisition, Consolidation, and Expression of Pavlovian Fear Conditioning.** *The Journal of Neuroscience*, November 29, 2006 • 26(48):12387–12396 (2006).
- WILSON, M.A.; MCNAUGHTON, B.L. **Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep.** *Science* 265, 676–679 (1994).
- WINER, J.A. **The Inferior Colliculus.** Springer, (2005).
- WITT, J.A.; HELMSTAEDTER, C. **Monitoring the cognitive effects of antiepileptic pharmacotherapy – approaching the individual patient.** *Epilepsy Behav* 2013;26:450-6. (2013).
- WORLEY, P. F. et al. **Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement.** *J Neurosci*, v. 13, n. 11, p. 4776-86, Nov 1993
- YANG, F.C.; LIANG, C.K. **Interactions of the dorsal hippocampus, medial prefrontal cortex and nucleus accumbens in formation of fear memory: Difference in inhibitory avoidance learning and contextual fear conditioning.** *Neurobiology of Learning and Memory* (2013).
- YANTIS, S.; JONIDES, J. **Abrupt visual onsets and selective attention: Voluntary versus automatic allocation.** *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, US, v. 16, n. 1, p. 121-134, 1990

ZHANG, S.; MANAHAN-VAUGHAN, D. **Spatial Olfactory Learning Contributes to Place Field Formation in the Hippocampus**. *Cerebral Cortex* February 2015;25:423–432 (2015).

ZHANG, Y.; FUKUSHIMA, H.; KIDA, S. **Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory**. *Molecular brain* (2011).

ZHAO, D.Y.; WU, X.R.; PEI, Y.Q.; ZUO, Q.H. **Kindling phenomenon of hyperthermic seizures in the epilepsy-prone versus the epilepsy-resistant rat**. *Brain Res.* 1985;358(1–2):390–393. (1985).

9. ANEXOS

Artigos publicados durante o doutorado.

Accepted Manuscript

Auditory processing assessment suggests that wistar audiogenic rat neural networks are prone to entrainment

Hyorrana Priscila Pereira Pinto, Vinícius Rezende Carvalho, Daniel de Castro Medeiros, Ana Flávia Santos Almeida, Eduardo Mazoni Andrade Marçal Mendes, Marcio Flávio Dutra Moraes

PII: S0306-4522(17)30063-5
 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.043>
 Reference: NSC 17579

To appear in: *Neuroscience*

Received Date: 14 October 2016
 Revised Date: 24 January 2017
 Accepted Date: 26 January 2017



Epilepsy & Behavior xxx (2015) xxx–xxx

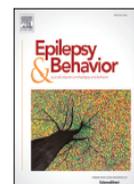


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Epilepsy & Behavior

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



Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility

Gabriel Perfeito Castro^a, Daniel de Castro Medeiros^{a,b}, Leonardo de Oliveira Guarnieri^a, Flávio Afonso Gonçalves Mourão^{a,b}, Hyorrana Priscila Pereira Pinto^a, Grace Schenatto Pereira^a, Márcio Flávio Dutra Moraes^{a,b,*}

^a Núcleo de Neurociências (NNC), Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brazil

^b Centro de Tecnologia e Pesquisa em Magneto-Ressonância, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brazil