

EDUARDO EKMAN SCHENBERG

**Caracterização eletrofisiológica da circuitaria
hipocampal durante o ciclo sono-vigília do
rato**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Psicologia da Universidade de São
Paulo para a obtenção de título de
Doutor em Neurociências e
Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Koichi Sameshima

São Paulo
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Schenberg, Eduardo Ekman.

Caracterização eletrofisiológica da circuitaria hipocampal durante o ciclo sono-vigília do rato / Eduardo Ekman Schenberg; orientador Koichi Sameshima. -- São Paulo, 2010.

153 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Hipocampo 2. Sono REM 3. Sono NREM 4. Ciclo vigília - sono
5. Ratos I. Título.

QP383.25

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduardo Ekman Schenberg

Caracterização eletrofisiológica da circuitaria hipocampal durante o ciclo sono-vigília do rato.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Doutor em Neurociências e Comportamento

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho e aos meus pais, por tudo que fizeram por mim. Espero poder retribuir de todas as maneiras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao **Prof. Dr. Koichi Sameshima** pela valiosa oportunidade.

Ao **Dr. Edgard Morya** pela ajuda dia e noite, segunda a sábado, às vezes até domingo.

Ao **Prof. Dr. Miguel A. L. Nicolelis** pelo empenho incansável em trazer ao Brasil o estado-da-arte da eletrofisiologia.

À **Prof^a. Dr^a. Maria Gabriela Menezes Oliveira**, que sempre me apoiou, mesmo quando tomei as decisões mais estranhas e por vezes equivocadas.

Ao **Prof. Dr. João Ricardo Sato** pela ajuda essencial na fase final deste trabalho.

Aos meus pais, **Paulo Schenberg** e **Luiza Maria Ekman Schenberg** por me incentivar à carreira científica e pelo apoio, sempre.

À **Luciana de Oliveira Kater**, que acompanhou todo o desenvolvimento do projeto e de sua execução e dividiu alegrias e tristezas, me suportando inclusive nos momentos mais difíceis. Sem este apoio certamente eu não teria conseguido sequer metade do que fiz.

Ao brilhante engenheiro e inventor **Gary Lehew**, pelo apoio também incansável e por possibilitar a utilização e construção de suas matrizes de eletrodos bem longe de sua terra natal.

Ao grupo de eletrofisiologia do Laboratório Cesar Timo-Iaria do IEP-HSL em parceria com a AASDAP: **Rafael Proença, Julien Calais, Daniel Y. Takahashi, Carlos Stein, Taísa Miranda, Marina Faveri, Marisa Montenegro** e **Ana Carolina Kunicki**, pelas discussões instigantes, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho e por terem aguentado um cara como eu num momento difícil com este, de escrever tese de doutorado.

Ao Professor da Faculdade de Medicina da Universidade do Chile, **Prof. Dr. Pedro Maldonado** e aos seus alunos **Rodrigo Montefusco, Hachi Mansur** e **Andrea Helo** pela valiosa interação e troca de experiências no vasto e complexo campo da eletrofisiologia e da análise de sinais.

Ao grupo de estudos em memória do departamento de psicobiologia da UNIFESP: **Paula Tiba, Tatiana Ferreira, Juliana Soares, Raquel Fornari e Karin Moreira** pela excelente convivência e amizade.

Ao **Prof. Dr. Luís Eugênio de Araújo Moraes Mello e Silvia Kohek** pela ajuda com a técnica de Neo-Timm para histologia.

À **Hellen Della Justina**, de Curitiba, pela ajuda no alinhamento das fotografias da histologia.

Ao grande cientista e amigo **Dr. Fabrício Pamplona** pela convivência excepcional.

À **Dr^a. Andrea Baldocchi Pizzo**, pela ajuda constante desde meu mestrado.

Aos colegas no curso de *Neuroinformatics* no MBL em Woodshole, MA, EUA, 2009: **Francois Szimansky, Prasad Shirvalkar e Kevin Cury**.

Aos **Profs. Drs. Luiz Roberto Britto e Sidarta Ribeiro** pelas valorosas discussões que melhoraram o trabalho a partir do exame de qualificação.

A todos os membros das bancas de qualificação e defesa.

Ao **Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo** pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao **Departamento de Psicobiologia da UNIFESP** pela disponibilização do criostato.

Ao **Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês** pela disponibilização de parte da infra-estrutura necessária ao desenvolvimento desse projeto.

À **Associação Alberto Santos Dummont para Apoio à Pesquisa (AASDAP)** pela disponibilização de parte da infra-estrutura necessária ao desenvolvimento desse projeto.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão, por três anos, da bolsa de estudos (processo 2006/04351-9) para o desenvolvimento desse projeto.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão, por um ano, de bolsa que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

À **International Brain Research Organization (IBRO)**, pelas inúmeras e valiosíssimas oportunidades. Sem dúvida nenhuma fazendo da neurociência uma jornada muito mais aprazível e proveitosa.

À **Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC)**, pelo apoio cada vez maior aos envolvidos nesta área de pesquisa no Brasil.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho e que não foram especificamente mencionados.

“An inquiry has to proceed from a state of openness with respect to the question at issue and to what the answer may be [...]. This kind of openness can make individuals receptive to fresh insights and new discoveries; and when combined with the natural human quest for understanding, this instance can lead to a profound expanding of our horizons.”

XIV Dalai Lama - The universe in a single atom

RESUMO

Schenberg, E. E. **Caracterização eletrofisiológica da circuitaria hipocampal durante o ciclo sono-vigília do rato.** 2010. 153 p. Dissertação (Doutorado) – Instituto de Psicologia – Neurociências e Comportamento, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Estrutura central do hipocampo, o corno de Ammon pode ser subdividido em pelo menos três áreas: CA1, CA2 e CA3. Enquanto CA1 e CA3 foram extensamente estudados, dado o envolvimento do hipocampo em processos cognitivos como a memória e patológicos como a epilepsia, CA2 tem sido largamente ignorado na literatura. Entretanto, este campo possui características específicas, tanto neuroanatômicas como bioquímicas e fisiológicas, sendo resistente à indução de plasticidade e recebendo aferência específica do núcleo supramamilar do hipotálamo, envolvido na circuitaria geradora/mantenedora do ritmo teta, oscilações centrais ao funcionamento do hipocampo. O objetivo deste estudo foi, portanto, caracterizar no animal em livre movimentação os padrões de atividade eletrofisiológica nas três áreas do corno de Ammon bilateralmente. Os resultados demonstraram que CA2 possui, em média, intervalos entre disparos mais prolongados que CA1 e CA3 durante o sono de ondas lentas e o sono REM. Nestas fases do ciclo a coerência entre CA1-CA2 foi mais elevada que entre CA1-CA3 e CA2-CA3 nos três ratos avaliados, em três faixas de frequência: teta (6 a 12 Hz), gama lento (30 a 50 Hz) e gama rápido (90 a 110 Hz) ipsilateralmente. A coerência entre campos contralaterais é predominante no teta, sendo quase zero nas demais frequências. Estes resultados corroboram trabalhos recentes que apontam CA2 como área distinta e sugerem que esta pequena região do corno de Ammon possa exercer papéis importantes na modulação da atividade das demais estruturas hipocampais e parahipocampais em processos de memória e em patologias como a epilepsia.

Palavras-chave: Hipocampo. Sono REM. Sono NREM. Ciclo vigília – sono. Ratos

ABSTRACT

Schenberg, E. E. **Electrophysiological characterization of the hippocampal circuitry during the sleep-wake cycle of the rat.** 2010. 153 p. Thesis (PhD) – Instituto de Psicologia – Neurociências e Comportamento, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The Ammon's horn, central structure of the hippocampus, can be subdivided in at least three regions: CA1, CA2 and CA3. While CA1 and CA3 have been extensively studied given the hippocampus involvement in cognitive processes such as memory and pathological ones such as epilepsy, CA2 remains largely ignored. However, this sector contains specific neuroanatomical, biochemical e physiological characteristics, being resistant to induction of plasticity and receiving a specific afference from the supramammillary nucleus in the hypothalamus, involved in the generation/maintenance of the theta rhythm, central oscillations to hippocampal functioning. Therefore, the objective of this study was to characterize electrophysiological patterns of interaction in the three areas of the Ammon's horn bilaterally. Results revealed that CA2 has a mean interspike interval larger than CA1 and CA3 during slow wave and REM sleep. During these stages of the sleep-wake cycle, coherence between CA1-CA2 was higher than CA1-CA3 and CA2-CA3 in the three animals evaluated, in three frequency bands: theta (6 to 12 Hz), slow gamma (30 to 50 Hz) and fast gamma (90 to 110 Hz) ipsilaterally. Coherence between contralateral fields was predominant in the theta band and almost zero in other frequencies. These results add to some previous published data showing that CA2 is distinct from the other subfields and that this small region of the Ammon's horn may exert important roles in modulating activity in the other hippocampal fields and parahippocampal regions during memory and pathologies such as epilepsy.

Keywords: HIPPOCAMPUS; REM SLEEP; NREM SLEEP; SLEEP-WAKE CYCLE; RATS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Circuitaria trissináptica.	25
Figura 2 – Alças paralelas.	26
Figura 3 – Representação esquemática da circuitaria córtico-hipocampal.	33
Figura 4 – Sincronização de diversas áreas neocorticais com o hipocampo.	34
Figura 5 - Matrizes de eletrodos construídas na Duke University.	57
Figura 6 - Equipamento utilizado para realização de moldes para matrizes.	58
Figura 7 - Foto de fio antes e depois de cortar em bisel.	59
Figura 8 - Fios posicionados em um molde.	59
Figura 9 - Fixação dos fios em um feixe fixo.	60
Figura 10 - Placa customizada e micro conector Omnetics®.	60
Figura 11 - Detalhe do encaixe entre o conector e a placa.	61
Figura 12 - Detalhe de soldas entre o conector e a placa.	61
Figura 13 - Fios colados na placa.	62
Figura 14 - Plano arquitetônico de matriz para o hipocampo, vista superior.	63
Figura 15 - Plano arquitetônico de matriz para o hipocampo, vista coronal.	63
Figura 16 - Fotografias de encéfalo após implante com a dura-máter.	64
Figura 17 - Encéfalo com implantes bilaterais e retirada da dura-máter.	65
Figura 18 - Vista inferior do crânio após remoção do encéfalo.	65
Figura 19 - Detalhe de duas matrizes após remoção do encéfalo.	66
Figura 20 - Fotografia de corte de hipocampo corado com a técnica de Nissl.	67
Figura 21 - Fotografia de corte de hipocampo corado com a técnica de Neo-Timm.	68
Figura 22 - Fotografia de corte de HPC corado com Neo-Timm e Cresil Violeta.	68
Figura 23 - Histologia de hipocampo em cirurgia sem retirada da dura-máter.	69
Figura 24 - Alinhamento digital de imagens.	69
Figura 25 - Fotografias de cortes de hipocampo mostrando panorama de implante.	70
Figura 26 - Fotografias ilustrando fios em CA1, CA2 e CA3.	71
Figura 27 - Traçados de potenciais de campo local, escala de horas.	73
Figura 28 - Traçados de potenciais de campo local, escala de minutos.	74
Figura 29 - Espectrograma de um canal com pouco ruído.	75
Figura 30 - Espectrograma de um canal com ruído.	75
Figura 31 - Traçados de um canal com ruído e dos 15 componentes da ACI.	76
Figura 32 - Espectrogramas de 15 componentes da ACI na mesma escala de cor.	77
Figura 33 - Espectrogramas de 15 componentes da ACI em escalas de cor individuais.	77
Figura 34 - Traçados e espectrogramas de um canal e dois componentes.	78
Figura 35 - Traçado e espectrograma com ruído antes da ACI.	79
Figura 36 - Traçado e espectrograma com ruído após a ACI.	80
Figura 37 - Correlação entre quatro canais antes da ACI.	81
Figura 38 - Correlação entre quatro canais após a ACI.	82
Figura 39 - Fotografias do aparato comportamental.	83
Figura 40 - Fotos representativas de cada estado comportamental.	84
Figura 41 - Traçados de potenciais de campo local a cada estágio do ciclo sono vigília.	85
Figura 42 - Espectrograma com nomes dos estágios.	86

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Número total de artigos sobre hipocampo e córtex visual.	20
Gráfico 2 - Taxas de disparo por área e estágio do ciclo sono vigília.	88
Gráfico 3 - Intervalos entre disparos por área e estágio do ciclo sono vigília.	89
Gráfico 4 - Razão entre salvas e disparos simples por área e estágio do ciclo sono vigília. ...	91
Gráfico 5 - Número de disparos por salva, para cada área e estágio do ciclo sono vigília.	92
Gráfico 6 - Coerência entre os pares de regiões ipsi e contralaterais para o animal ES57.	93
Gráfico 7 - Coerência entre os pares de regiões ipsi e contralaterais para o animal ES59.	94
Gráfico 8 - Coerência entre os pares de regiões ipsi e contralaterais para o animal ES60.	95
Gráfico 9 - Resultados estatísticos da coerência para o animal ES57 no SOL.	96
Gráfico 10 - Resultados estatísticos da coerência para o animal ES57 no REM.	96
Gráfico 11 - Resultados estatísticos da coerência para o animal ES59 no SOL.	97
Gráfico 12 - Resultados estatísticos da coerência para o animal ES59 no REM.	97
Gráfico 13 - Resultados estatísticos da coerência para o animal ES60 no SOL.	98
Gráfico 14 - Resultados estatísticos da coerência para o animal ES60 no REM.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos e quantidades de matrizes construídas ao longo do projeto.	62
Tabela 2 - Quantidade de animais utilizados por etapa do trabalho.	64
Tabela 3 - Quantidade de unidades isoladas dos registros de disparos em cada região.	82
Tabela 4 - Quantidade de unidades analisadas estatisticamente.....	83
Tabela 5 - Resultados da análise de variância realizada para a taxa de disparo.	87
Tabela 6 - Resultados do teste a posteriori de Bonferroni para a taxa de disparo.....	88
Tabela 7 - Resultados da análise de variância realizada para o intervalo entre disparos.	89
Tabela 8 - Resultados do teste a posteriori de Bonferroni para o intervalo entre disparos. ...	89
Tabela 9 - Quantidade de unidades de cada região que dispararam em salvas.	90
Tabela 10 - Resultados da análise de variância para a razão entre salvas e disparos simples. 90	
Tabela 11 - Resultados do teste a posteriori de Bonferroni para a razão entre salvas e disparos simples.....	90
Tabela 12 - Resultados do teste a posteriori de Bonferroni para a quantidade de disparos por salva.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACI	Análise de componentes independentes
ACP	Análise de componentes principais
AL	Auto limpeza (grooming, estágio do ciclo sono-vigília)
ANOVA	Análise de variância
AP	Ântero-Posterior
CA1	Área 1 do corno de Ammon
CA2	Área 2 do corno de Ammon
CA3	Área 3 do corno de Ammon
CE	Córtex Entorrinal
DV	Dorso-Ventral
EEG	Eletroencefalograma
e.p.	erro padrão (estatística)
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
GD	Giro Denteado
H.M.	Henry Molaison
HPC	Hipocampo
i.c.v.	intracerebroventricular (injeção)
i.p.	intraperitoneal (injeção)
LED	Diodo Emissor de luz
LTD	Depotenciação de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
ML	Médio-Lateral
M1	Córtex motor primário
NMDA	N-metil-D-aspartato
REM	sono REM (estágio do ciclo sono-vigília)
Son	Sonolência (estágio do ciclo sono-vigília)
SOL	Sono de ondas lentas (estágio do ciclo sono-vigília)
STDP	Plasticidade dependente de tempo de disparo (Spike-Timing Dependent Plasticity)
STEP	Fosfatase enriquecida no estriado (Striatal-Enriched Tyrosine Phosphatase)
SM	Septo Medial
SuM	Núcleo supramamilar do hipotálamo
TTL	Pulso lógico transistor-transistor (Transistor-Transistor Logic pulse)
VA	Vigília Ativa (estágio do ciclo sono-vigília)
VQ	Vigília Quieta (estágio do ciclo sono-vigília)
WL	Wilk's Lambda (efeito de interação, estatística)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
g	grama
mL	mililitro
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
mg/kg	miligrama (da droga) por quilograma (peso do animal)
µg	micrograma
cm	centímetro
mm	milímetro
µm	micrômetro
µm/s	micrômetro por segundo
h	hora
min	minuto
s	segundo
ms	milissegundo
Hz	hertz (ciclos por segundo)
kHz	quilohertz
Ω	ohm
MΩ	mega ohm
kΩ	quilo ohm
µF	micro Faraday
mV	milivolt

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1. Breve Histórico	18
1.2. Neuroanatomia	22
1.3. Eletrofisiologia	29
1.3.1. Oscilações e ritmos cerebrais.....	29
1.3.2. Oscilações na rede córtico-hipocampal.....	31
2. Objetivos	44
2.1. Objetivo geral	44
2.2. Objetivos específicos.....	44
3. Métodos.....	45
3.1. Aspectos Éticos.....	45
3.2. Animais	45
3.3. Eletrodos	46
3.4. Procedimentos Cirúrgicos.....	47
3.4.1. Anestesia.....	47
3.4.2. Cirurgia.....	47
3.5. Registro comportamental e eletrofisiológico	49
3.5.1. Análise de sinais	50
3.6. Classificação do ciclo sono-vigília	52
3.7. Eutanásia e Perfusão.....	53
3.8. Histologia	54
3.8.1. Cortes em criostato.....	54
3.8.2. Coloração.....	54
3.8.3. Localização dos canais	55
3.9. Estatística.....	55
4. Resultados.....	57
4.1. Eletrodos	57
4.1.1. Matrizes importadas.....	57
4.1.2. Construção de eletrodos.....	58
4.2. Animais	63
4.3. Cirurgia, perfusão e remoção do encéfalo.....	64
4.4. Histologia	66
4.4.1. Testes iniciais.....	66
4.4.2. Aprofundamento tecidual.....	69
4.4.3. Alinhamento de fotografias.....	69
4.4.4. Localização de canais.....	70
4.5. Análise de sinais	72
4.5.1. Potenciais de campo local.....	72
4.5.2. Disparos Multiunitários.....	82
4.6. Ciclo sono vigília	83
4.6.1. Classificação dos estágios	83
4.6.2. Duração dos estágios	86
4.6.3. Descartes por ruído de artefato	87
4.6.4. Padrões de disparo ao longo do ciclo.....	87
4.6.5. Interações hipocampais ao longo do ciclo sono vigília.....	92

5. Discussão	100
6. Conclusão.....	110
7. Referências	112
8. Apêndices	137
8.1. Apêndice A - Perdas devido a ruído e problemas em canais	137
8.2. Apêndice B - Duração dos Estágios.....	139
8.3. Apêndice C - Número de janelas de 10 s por estágio.....	140
8.4. Apêndice D - Valores de disparos multiunitários	141
8.5. Apêndice E - Resultados da estatística da coerência	142
9. Anexos	148
9.1. Anexo A	148
9.2. Anexo B.....	149
9.3. Anexo C.....	150
9.4. Anexo D	151

1. Introdução

“Nothing is easier than to formulate high ideals, but few things are more difficult than to discover the means whereby those ideals may be implemented. One has to dream, but to dream in a pragmatic way”

Aldous Huxley

1.1. Breve Histórico

O caso do paciente Henry Molaison, falecido em dezembro de 2008, até então conhecido somente como H.M., levou à fama não somente o protagonista, mas também uma região do cérebro: o hipocampo. O paciente sofria de severas crises epiléticas à época intratáveis por medicamentos e a solução encontrada, após avaliação de alterações difusas no eletroencefalograma (EEG), foi a remoção cirúrgica bilateral do lobo temporal medial, que sabia-se estar envolvido em convulsões (SCOVILLE; MILNER, 1957). Após a cirurgia, H.M. apresentou melhoras drásticas em suas crises epiléticas, mas para espanto e surpresa de todos os envolvidos, H.M. tinha perdido suas memórias. Entretanto, conforme os trabalhos originais de Brenda Milner (MILNER; CORKIN; TEUBER, 1968; PENFIELD; MILNER, 1958; SCOVILLE; MILNER, 1957), psicóloga que acompanhou o paciente nos anos iniciais; e de Susan Corkin, que o acompanhou posteriormente (CORKIN, 2002; MILNER; CORKIN; TEUBER, 1968), a amnésia de H.M. não era global. Era principalmente do tipo anterógrada, ou seja, o paciente se encontrava incapacitado para formar memórias de eventos ocorridos após a cirurgia. Um grau moderado de amnésia retrógrada, isto é, incapacidade para recordar fatos ocorridos antes da cirurgia, também foi notado, mas era limitado a poucos anos antecedentes à intervenção cirúrgica. Em ambos os casos, a amnésia era específica a fatos e eventos, o que hoje se denomina memória episódica (ou declarativa), enquanto a memória implícita, de habilidades ou procedimentos (não declarativa), estava preservada. Por exemplo, H.M. desempenhava igual a sujeitos controles (sem lesão alguma) em testes de desenho invertido no espelho¹, apesar de ser necessário explicar novamente o teste em todas as sessões, pois H.M. declarava nunca ter feito aquilo antes. Ou seja, o componente episódico (declarativo), do tipo “conheço isto, já fiz antes”, encontrava-se prejudicado, ou totalmente ausente, enquanto o desempenho, o componente implícito (ou não-declarativo), a resposta motora de desenhar, encontrava-se intacto.

¹ Teste no qual o sujeito deve desenhar manualmente seguindo um desenho impresso com duas linhas paralelas, por exemplo uma estrela, olhando apenas para o reflexo de sua mão e do desenho a ser copiado.

Na mesma época da cirurgia de H.M., o método de EEG, desenvolvido alguns anos antes (BERGER, 1929; HAAS, 2003), estava sendo utilizado por pesquisadores em uma outra série de pesquisas com resultados de profundo impacto. Entre as décadas de 1930 e 1950 foram publicados os primeiros estudos com análise das oscilações cerebrais medidas com o EEG durante o sono, permitindo pela primeira vez discernir de maneira clara suas duas principais fases: o sono de ondas lentas (SOL) e o sono REM (do inglês “Rapid Eye Movement”), ou sono paradoxal² (ASERINSKY; KLEITMAN, 1953; BERGER, 1929; DAVIS et al., 1937). Pesquisas subseqüentes sobre sono e cognição não tardaram em demonstrar a relação entre o sono e a memória, iniciando o que hoje é uma vasta área de pesquisa (BLISSITT, 2001; BRENNER; SCHWARTZ; MAQUET, 1998; GIUDITTA et al., 1995; MAQUET, 2001; MAQUET; RUBY, 2004; PEIGNEUX et al., 2001; SMITH; LAPP, 1991; STICKGOLD, 2006; STICKGOLD et al., 2001; WALKER, 2005).

Os resultados com sono e memória criaram então elo direto entre duas linhas de pesquisa aparentemente distintas: intervenções cirúrgicas para tratamento de epilepsia e estudos de EEG sobre o sono. Estes resultados colocaram o hipocampo no centro de pelo menos três questões neurocientíficas importantes: os processos fisiológicos da memória e do sono e os processos patológicos da epilepsia. Central ao entendimento de todas as três, como já demonstravam os estudos pioneiros, está o entendimento dos padrões eletrofisiológicos no hipocampo e estruturas a ele conectadas. As distintas oscilações que ocorrem durante o sono estão intrinsecamente relacionadas à memória e perturbações e alterações nestes mesmos ritmos eletro-oscilográficos são registradas em distúrbios severos como convulsões e quadros epilépticos.

Nos anos seguintes o hipocampo tornou-se, portanto, alvo de inúmeras pesquisas, tanto em seres humanos quanto em animais de experimentação de diversas espécies. Pesquisa bibliográfica nas bases de dados ISI Web of Knowledge e PubMed mostram que o hipocampo é provavelmente a estrutura cerebral mais estudada até hoje (Gráfico 1).

Com base em outros estudos de pacientes com lesões variadas e de lesões controladas e intervenções farmacológicas feitas em animais experimentais, pôde-se confirmar que as memórias

² Há extensas discussões na literatura sobre a terminologia mais apropriada. No caso do rato, o termo REM é criticado pelo fato de que o animal não apresenta movimentos oculares característicos como os humanos. Entretanto, por ser o mais empregado na literatura atual, neste trabalho optamos pela utilização do termo sono REM.

episódicas dependem do hipocampo por um período limitado de tempo. Ou seja, o hipocampo é crucial para a formação destas memórias e sua consolidação inicial, sendo que lentamente outras estruturas corticais vão armazenando estes traços mnemônicos, deixando o hipocampo livre para iniciar novamente o processo com novos eventos (GERLAI, 2001; MISHKIN e t a l., 1997; SQUIRE, 2004; SQUIRE; BAYLEY, 2007; SQUIRE; CAVE, 1991; SQUIRE; STARK; CLARK, 2004; ZOLA-MORGAN; SQUIRE; AMARAL, 1989).

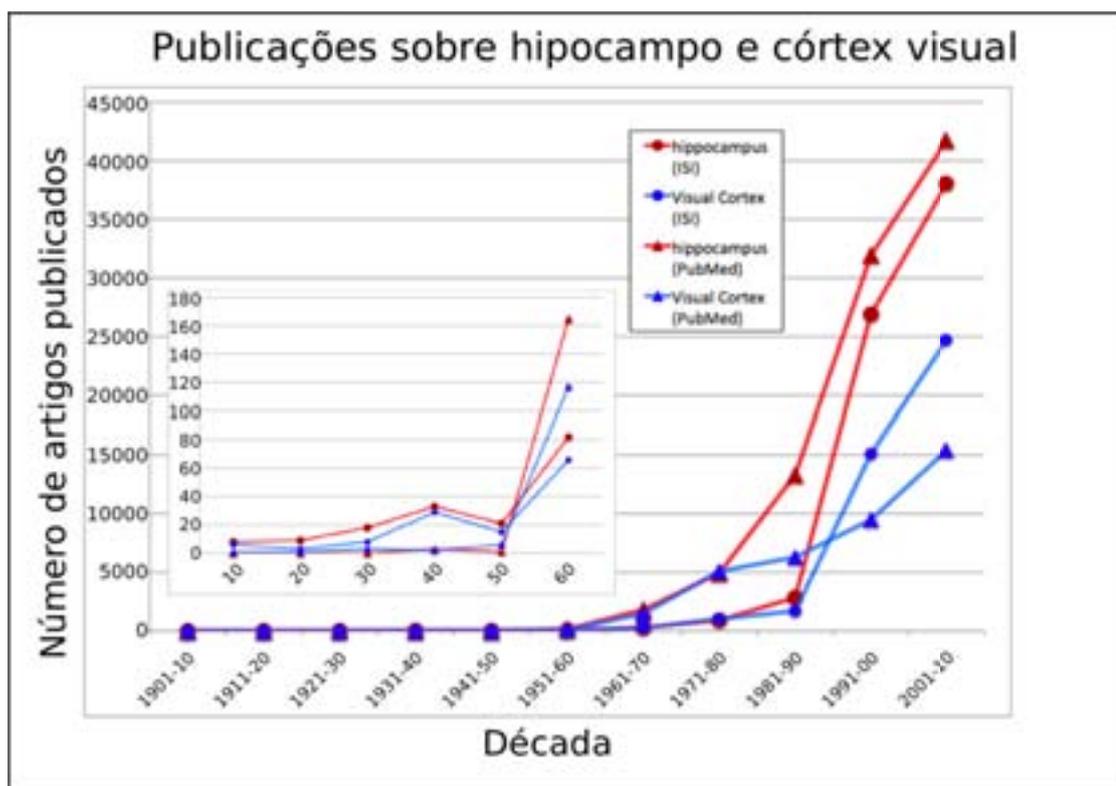


Gráfico 1 - Número total de artigos indexados nas bases de dados ISI Web of Knowledge (círculos) e PubMed (triângulos) para as palavras-chave “hipocampus” (em vermelho) e “visual cortex” (em azul) nas décadas entre 1901 e 2010. O córtex visual é a região mais estudada do neocórtex e portanto foi escolhido para comparação com o hipocampo. Os valores para o hipocampo na década atual ultrapassam os 40.000 artigos publicados, segundo o resultado no PubMed, e superam os valores do córtex visual em ambas as bases de dados desde a década de 1990. A miniatura mostra os dados até a década de 60 em escala ajustada para melhor visualização. Importante notar que o aumento inicial ocorreu justamente entre os anos de 1950 e 1960, época da publicação do caso H.M. (SCOVILLE; MILNER, 1957), que atraiu muita atenção para o hipocampo. Curiosamente, para o córtex visual também houve aumento nesta mesma década, catalisado pelos trabalhos de Hubel e Wiesel com os campos receptivos (HUBEL; WIESEL, 1959), revelando o crescimento das neurociências em geral a partir desta época. Resultados obtidos em 21 de março de 2010.

Com o passar dos anos, diversas outras técnicas foram utilizadas para se estudar o papel do hipocampo tanto na memória como no sono e em quadros convulsivos. Os resultados deram origem a descobertas históricas e de grande relevância na neurociência atual, como, por exemplo, a

existência de plasticidade sináptica no sistema nervoso central (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; BLISS; LOMO, 1970; MORRIS et al., 2003) e da existência de neurogênese também no cérebro adulto (GOULD, 2007; KAPLAN; HINDS, 1977; LAPLAGNE et al., 2006; LIE et al., 2005; SCHINDER; GAGE, 2004). O hipocampo tornou-se ainda alvo de algumas das pesquisas neurocientíficas mais excêntricas que se têm notícia, como no experimento em que foram registradas células do hipocampo de um rato durante uma viagem espacial da NASA (KNIERIM; MCNAUGHTON; POE, 2000), um recente experimento com “realidade virtual” em camundongos, permitindo pela primeira vez registro intracelular de células hipocampais em animais acordados (HARVEY et al., 2009), experimentos com registros intracerebrais em humanos, nos quais registraram a “célula da Jennifer Aniston” e a “célula da Halle Berry”³ (QUIAN QUIROGA et al., 2005) e também o trabalho em andamento em que estão realizando fatias e análises histológicas do cérebro de H.M. e transmitindo ao vivo pela internet (UCSD, 2010).

Apesar dos enormes avanços após pouco mais de cinco décadas do relato do caso H.M. e dos estudos iniciais com EEG e sono, muitas controvérsias persistem a respeito das funções cognitivas do hipocampo (JEFFERY, 2007; MIZUMORI, 2006; O'KEEFE, 1999; REDISH, 2001; SHIRVALKAR, 2009), como, por exemplo, quais as diferenças entre subáreas do hipocampo nestes processos (LEE; HUNSAKER; KESNER, 2005; LEE; JERMAN; KESNER, 2005; LEE; KESNER, 2004a; LEE; RAO; KNIERIM, 2004; URBAN; HENZE; BARRIONUEVO, 2001), qual a relação entre os resultados sobre memória em ratos, primatas e humanos (BUZSÁKI, 2005; BUZSÁKI, 2005a; EICHENBAUM, 1999; 2000; 2004; EICHENBAUM et al., 1999; TANILA, 1999) e qual a influência do sono nas funções do hipocampo, especialmente na consolidação da memória e na transferência do traço mnemônico para o neocórtex (BORN; RASCH; GAIS, 2006; BUZSÁKI, 1996; 1998; RIBEIRO; NICOLELIS, 2004; STICKGOLD, 2005; TONONI; CIRELLI, 2003; 2006; TONONI; MASSIMINI; RIEDNER, 2006; WALKER; STICKGOLD, 2006). Neste trabalho nos concentramos, como será descrito a seguir, em estudar os padrões de oscilações eletrofisiológicas e de disparos celulares na parte central do hipocampo, o corno de Ammon. Para estudar minuciosamente a eletrofisiologia desta circuitaria de grande relevância, foi necessário a

³ Atrizes norte-americanas famosas por filmes e seriados de TV. Registros em pacientes olhando séries de fotos encontraram uma célula específica que disparava potenciais de ação em alta frequência ao serem exibidas quaisquer fotos da atriz Jennifer Aniston. Outra célula disparava em frequência elevada para fotos ou até mesmo o nome de Halle Berry mostrado na tela do computador.

utilização de modelo animal que permite realizar implantes de eletrodos intracerebrais com posterior verificação histológica da localização destes nas diferentes áreas do corno de Ammon.

1.2. Neuroanatomia

O ponto de partida mais seguro para se iniciar o estudo do sistema nervoso é sem dúvida a neuroanatomia. O estudo detalhado da anatomia hipocampal começou, como grande parte da neuroanatomia, com o trabalho meticoloso e genial do espanhol Santiago Ramón y Cajal (RAMÓN Y CAJAL, 1909). Cajal demonstrou que o hipocampo recebia suas aferências principalmente pela área entorrinal e pelo giro límbico, através do cíngulo. As eferências do hipocampo teriam destino subcortical, navegando pela fimbria⁴. Cajal estabeleceu que as aferências se distribuíam de maneira razoavelmente uniforme pelo hipocampo e o subdividiu em Giro Denteado (GD), corno de Ammon e região subicular. O corno de Ammon, parte central do hipocampo, poderia ser subdividido em região superior e região inferior, dada principalmente a diferença no tamanho das células piramidais, maiores na camada inferior; e também na posição anatômica e projeções para o complexo subicular e deste ao hipocampo. Entretanto, a terminologia mais utilizada atualmente, CA3 e CA1, bem como a correta avaliação do destino das eferências hipocampais, são resultados de um dos mais brilhantes alunos de Cajal, Rafael Lorente de Nó (LORENTE DE NÓ, 1934)⁵. Lorente de Nó aprofundou os estudos de Cajal no hipocampo e notou que, além das diferenças celulares, o giro denteado e o corno de Ammon recebiam projeções aferentes muito específicas, que chamou de “parcialmente sobrepostas”. Baseado em seus detalhados estudos em roedores e primatas, ele subdividiu o corno de Ammon em quatro regiões, denominadas “CA”, de Cornu Ammonis e numeradas de 1 a 4. Segundo Lorente de Nó, CA4 é a região em que o corno de Ammon encontra o GD, classificada por Cajal como camada polimórfica do GD. Lorente de Nó argumenta que as camadas polimórficas se fundem nesta região e que de acordo com os tipos celulares e projeções em diversas espécies seria mais preciso e coerente classificá-la como parte do corno de Ammon do que do GD; CA3 é a região proximal ao GD e que recebe deste as projeções das fibras musgosas, correspondente à região inferior de Cajal; CA1 é a região que Cajal denominou superior, que não recebe as fibras musgosas do GD e emite a grande maioria das eferências do corno de Ammon,

⁴ Este equívoco sobre o destino das eferências hipocampais é talvez um dos poucos pontos em que Cajal se equivocou em todos os seus estudos sobre o sistema nervoso (BUZSÁKI, 2006).

⁵ O artigo original, de 1934, é muito difícil de ser encontrado na internet, apesar da importância histórica e do elevado número de citações. Uma cópia em papel foi gentilmente enviada pelo Prof. Jorge Larriva-Sahd da UNAM, no México, autor de biografia sobre Lorente de Nó (LARRIVA-SAHd, 2002), pela qual somos extremamente gratos.

principalmente ao subículo; por fim, entre CA3 e CA1 haveria ainda um pequeno campo distinto, que Lorente de Nó chamou de CA2. Situadas exatamente após o término dos axônios mais extensos das fibras musgosas, estas células não fazem sinapses com as fibras musgosas, pois não possuem as características “excrescências espinhosas” observadas nos dendritos de CA3 que fazem sinapses com estas fibras oriundas do GD. Este resultado foi confirmado seis décadas mais tarde por técnicas mais avançadas de injeção de corante intracelular e mapeamento digital tridimensional da estrutura neuronal (ISHIZUKA; COWAN; AMARAL, 1995). Apesar de atualmente parte da terminologia de Lorente de Nó ser extensamente empregada, o campo CA2 tem sido largamente ignorado na literatura e foi considerado por alguns como pequena área de transição entre CA3 e CA1 (BERNARD; WHEAL, 1994; GROVE; TOLE, 1999). Já ciente das dificuldades desde o início, Lorente de Nó destacou em seu trabalho de 1934 que

“[...] poucos problemas podem ser resolvidos sem estudar simultaneamente as outras áreas corticais afluentes ao corno de Ammon.” (tradução nossa)

Assim sendo, o autor destacou a existência de duas vias distintas intrínsecas do corno de Ammon: um feixe de fibras partindo de CA3, inicialmente descrito por Schaffer (e que portanto leva o nome de colaterais de Schaffer), que faz sinapses em CA2 e CA1 e portanto conecta distintos campos em um mesmo setor da extensão septo-temporal do hipocampo; e um segundo feixe, que corre paralelo ao eixo principal do hipocampo (ou seja, no eixo septo-temporal), situando-se perpendicularmente aos colaterais de Schaffer e conectando então distintos setores da extensão septo-temporal. Este feixe se iniciaria em CA2, mas devido a técnicas um tanto quanto imprecisas, Lorente de Nó argumentou que

“[...] estudos futuros talvez possam provar a existência deste campo com talvez algumas conexões particulares.” (tradução nossa)

Diversos pesquisadores dedicaram-se, nas décadas seguintes, a mapear em grandes detalhes a circuitaria que envolve o hipocampo (CENQUIZCA; SWANSON, 2006; 2007; KOGANEZAWA et al., 2008; LOPES DA SILVA et al., 1990; RISOLD; SWANSON, 1996; SWANSON; WYSS; COWAN, 1978; VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009; WITTER et al., 2000; WOODHAMS et al., 1993). Foge do escopo do presente trabalho revisar exaustivamente todos os detalhes neuroanatômicos, mas alguns pontos que têm sido ignorados ou simplificados em demasia,

com potencial influência na compreensão do processo fisiológico de interação córtico-hipocampal serão destacados.

As conexões da circuitaria hipocampal mais estudadas são as que ocorrem com o manto cortical (CENQUIZCA; SWANSON, 2007; JONES; WITTER, 2007; KAJIWARA et al., 2008; LOPES DA SILVA et al., 1990; MILLER, 1989; VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009; WITTER et al., 2000). Esta via traz impulsos sensoriais de diversas áreas corticais primárias, secundárias e de associação; estas vias multisensoriais passam pelo córtex péri-rinal e pós-rinal, afunilando-se no córtex entorrinal (CE) e subículo, tanto na entrada quanto na saída das fibras do hipocampo (AGSTER; BURWELL, 2009; BURWELL, 2000; BURWELL; AMARAL, 1998; BUZSÁKI, 1996; CENQUIZCA; SWANSON, 2007; LOPES DA SILVA et al., 1990; WITTER et al., 2000). As projeções glutamatérgicas do CE originam a famosa circuitaria trissináptica (BARR et al., 2006; BENES et al., 2008; GOODRICH-HUNSAKER; HUNSAKER; KESNER, 2008; HERRERAS et al., 1987; NAKAGAMI; SAITO; MATSUKI, 1997; VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009; YECKEL; BERGER, 1990), uma via seqüencial de sinapses glutamatérgicas excitatórias. Esta circuitaria se inicia por meio da via perfurante, que parte do CE e faz a primeira sinapse da via no GD; dali seguem os axônios das células granulares, formando as fibras musgosas, que fazem sinapse na porção proximal dos dendritos das células piramidais de CA3 (HENZE; URBAN; BARRIONUEVO, 2000; URBAN; HENZE; BARRIONUEVO, 2001); por fim, os colaterais de Schaffer fazem a terceira sinapse da via também na porção proximal dos dendritos das células piramidais de CA1 (HERRERAS et al., 1987; KESNER, 2007; YECKEL; BERGER, 1990) (Figura 1).

Esta via foi tida como a característica principal do hipocampo por muitos anos, por se tratar de uma via excitatória seqüencial e unidirecional, distinta da arquitetura típica do neocórtex. A importância dada à via trissináptica é o fator pelo qual o campo CA1 é o mais investigado (juntamente, talvez, com sua posição anatômica em roedores, mais dorsal, facilitando intervenções experimentais).



Figura 1 - Circuitaria trissináptica. Representação esquemática da circuitaria trissináptica, que conecta o córtex entorrinal (CE) ao hipocampo (GD, CA3 e CA1). A via de projeção excitatória origina-se no CE e chega a CA1 passando por GD e CA3 em série. De CA1 estas projeções chegam novamente ao CE, principalmente através de relé no subículo (não representado). CE – Córtex Entorrinal. GD – Giro Denteado. CA3 – Área CA3 do corno de Ammon. CA2 - Área CA2 do corno de Ammon. CA1 - Área CA1 do corno de Ammon. SM – Septo Medial. SuM – Núcleo supramamilar do hipotálamo.

Entretanto, análise mais atenciosa mostra que a via trissináptica é apenas uma dentre várias alças paralelas que comunicam o hipocampo ao manto cortical e também a estruturas subcorticais. As projeções do CE chegam não somente ao GD, mas também de maneira direta a CA3, CA2 e CA1, formando uma via monossináptica, também chamada via temporoamônica, ligando o CE diretamente à porção distal dos dendritos em CA1; uma via bissináptica ligando o CE a CA3 e CA1 sem passar pelo GD, novamente fazendo sinapses nas porções distais das árvores dendríticas; a clássica via trissináptica e também uma via de quatro sinapses que passa pelo GD, CA3, CA2 e CA1 (STEWART, 1976; TAMAMAKI; ABE; NOJOYO, 1988; YECKEL; BERGER, 1990) (Figura 2).

A origem de estas alças no CE é praticamente segregada, sendo que os axônios da via perfurante que partem da camada II do CE projetam para as células granulares do GD e para as células piramidais de CA3, enquanto os da camada I projetam diretamente para CA1 pela via temporo-amônica (RAMON Y CAJAL, 1909; STEWART, 1976). As projeções de CA1 e do subículo para o CE chegam nas camadas profundas, fechando o circuito (CENQUIZCA; SWANSON, 2007). Adicionalmente, os axônios das células de CA3, que enviam projeções para CA2 e CA1 pelos colaterais de Schaffer, se bifurcam e enviam uma maciça projeção recorrente para outras células de CA3 e também para todo o hipocampo contralateral.

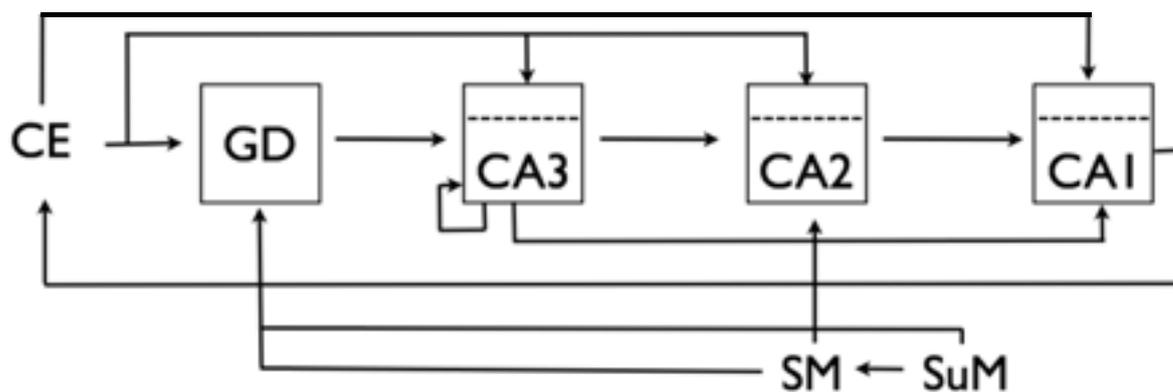


Figura 2 – Alças paralelas. Representação esquemática da circuitaria córtico-hipocampal, composta por diversas alças paralelas entre as distintas regiões. As linhas pontilhadas em CA1, 2 e 3 representam a separação em dendritos basais (abaixo) e apicais (acima), onde chegam as projeções intranscortais do hipocampo e as do córtex entorrinal, respectivamente. As projeções contralaterais não estão representadas. CE – Córtex Entorrinal. GD – Giro Denteado. CA3 – Área CA3 do corno de Ammon. CA2 – Área CA2 do corno de Ammon. CA1 – Área CA1 do corno de Ammon. SM – Septo Medial. SuM – Núcleo supramamilar do hipotálamo.

Além da divisão do corno de Ammon em distintas regiões, esta estrutura está organizada em até sete camadas (LOPES DA SILVA et al., 1990): A primeira, adjacente à fissura hipocampal, é o stratum moleculare, que contém principalmente fibras e terminais dendríticos. A segunda é o stratum lacunosum, que consiste de feixes de fibras paralelas provenientes de células piramidais do próprio hipocampo e também de aferências externas⁶. O stratum radiatum é a terceira camada, onde existem corpos celulares esparsos e as fibras dos colaterais de Schaffer. A quarta camada é o stratum pyramidale, onde se localizam os corpos celulares das células piramidais, compactados e em alta densidade. Abaixo do stratum pyramidale está a quinta camada, o stratum oriens, que contém os dendritos basais das células piramidais, corpos celulares de distintos tipos celulares e as projeções recorrentes de CA3. A sexta camada é o alveus, que contém axônios das células piramidais e fibras aferentes. Por fim, a sétima camada é a zona epitelial, que forma a superfície ventricular do hipocampo.

As alças paralelas se localizam e fazem sinapse em camadas distintas e específicas. Os axônios originados no CE navegam no stratum lacunosum-moleculare e fazem sinapses sempre na extremidade distal dos dendritos das células granulares e piramidais, tanto no GD como em CA3 e CA1 (também existe uma projeção menos intensa pelo stratum oriens, fazendo sinapse na porção distal dos dendritos basais). Já os axônios de CA3 que fazem sinapse em CA2 e CA1 terminam nas

⁶ O número exato de camadas varia de acordo com autores, sendo que a maioria considera o stratum lacunosum e o stratum moleculare conjuntamente como stratum lacunosum-moleculare.

porções proximais da árvore dendrítica, enquanto as terminações recorrentes de CA3 e as projeções de CA3 ao hipocampo contralateral fazem sinapses em níveis intermediários da árvore dendrítica, situando-se entre os terminais originados no CE (localizados distalmente) e os originados na circuitaria intrínseca do hipocampo ipsilateral (localizados proximalmente) (ANDERSEN; SOLENG; RAASTAD, 2000; BUZSÁKI, 1996; FORSTER; ZHAO; FROTSCHER, 2006; FORSTER; ZHAO; FROTSCHER, 2006). Portanto, estas alças formam caminhos circulares nos quais os impulsos elétricos podem reverberar e atingir as mesmas células hipocâmpais em diversos momentos, sugerindo que a precisão temporal e a recorrência de atividade sejam algumas das características principais do hipocampo e de sua conseqüente comunicação com o neocórtex (BUZSÁKI, 1996; MILLER, 1989; 1991).

Adicionalmente, o hipocampo possui também conexões com estruturas subcorticais. Estas vias provenientes do tronco, incluindo o locus ceruleus, os núcleos da rafe e a formação reticular, chegam ao hipocampo após relé no septo medial e na parte vertical da banda diagonal de Broca. Estas estruturas enviam fibras colinérgicas e GABAérgicas para o córtex entorrinal (camadas II, IV e VI), GD e o corno de Ammon, sendo que as projeções para CA3 são mais densas que para CA1 e fazem sinapse exclusivamente em células inibitórias (PETSCHER; STUMPF; GOGOLAK, 1962; RISOLD; THOMPSON; SWANSON, 1997; STUMPF; PETSCHER; GOGOLAK, 1962). As principais eferências hipocâmpais para estas regiões partem de CA3 e correm pela fimbria-fórnix, que após relé no septo lateral (LS, lateral septum), inervam diversas áreas do tronco, tálamo e hipotálamo (CENQUIZCA; SWANSON, 2006; RISOLD; SWANSON, 1997; RISOLD; THOMPSON; SWANSON, 1997), incluindo o núcleo supramamilar (SuM) (KISS et al., 2000; LERANTH et al., 1999; PAN; MCNAUGHTON, 2004; VERTES, 1988). O SuM é um centro integrador da informação proveniente de diversos núcleos do tronco, que então repassa estas informações para áreas como o septo medial e lateral, o córtex entorrinal e o hipocampo (PAN; MCNAUGHTON, 2004; VERTES, 1988; WYSS; SWANSON; COWAN, 1979). As fibras de projeção de partes laterais do SuM partem para o septo e o hipocampo por meio de colaterais dos mesmos axônios (VERTES; MCKENNA, 2000) e terminam especificamente no GD e em CA2, enquanto as que partem de áreas mediais terminam exclusivamente em CA2 (BORHEGYI; LERANTH, 1997) e fazem sinapse nas células piramidais desta região (MAGLÓCZKY; ACSÁDY; FREUND, 1994). Estas projeções caracterizam portanto as aferências específicas a CA2

sugeridas, mas não encontradas, por Lorente de Nó seis décadas antes (LORENTE DE NÓ, 1934). Análise tridimensional da arborização axonal das células piramidais em CA2 completaram a distinção deste campo dos demais, ao mostrar que estes axônios conectam distintos setores da extensão septo-temporal do hipocampo, formam projeções simétricas no hipocampo contralateral e chegam inclusive a formar um plano no septo (TAMAMAKI; ABE; NOJYO, 1988).

Além da organização das alças paralelas que conectam as células piramidais dos distintos setores em camadas diferentes, o hipocampo possui um vasto e complexo sistema de células inibitórias cujo alvo é específico por camadas e regiões (FREUND; BUZSÁKI, 1996). Estudos recentes demonstraram a existência de pelo menos 21 tipos de células inibitórias no hipocampo (KLAUSBERGER; SOMOGYI, 2008; SOMOGYI; KLAUSBERGER, 2005), cuja atividade é específica no espaço e no tempo, i.e., distintos tipos de interneurônios inibem porções específicas de células piramidais em momentos distintos, criando um sofisticado mecanismo de oscilações neurais, seleções de sub-redes e a implementação de estados globais cerebrais. Também recentemente foram identificados dois tipos de interneurônios em cesto (basket cells) em CA2 por injeção de biocitina⁷. A minoria lembra interneurônios similares aos de CA1, com dendritos orientados verticalmente e axônios restritos à região de origem. Em contraste, a maioria das células era de células em cesto ou bi-estratificadas com dendritos horizontais, longos, com espinhas esparsas que se estendem por todos os CAs no stratum oriens. As células em cesto com dendritos esparsos inervam todos os CAs e estão, portanto, em posição privilegiada para inibir tanto CA1 quanto CA3 de maneira anterógrada e retrógrada, respectivamente. Por outro lado, as células bi-estratificadas inervam o stratum oriens e radiatum de CA1, mas param abruptamente na borda entre CA2 e CA3, podendo realizar deste modo apenas inibição anterógrada em CA1 (MERCER; TRIGG; THOMSON, 2007).

Resumindo, a anatomia intrínseca do hipocampo é caracterizada pela existência de alças paralelas e recorrentes entre os distintos CAs, sendo que a organização em camadas e sub-regiões permite às células do hipocampo desempenhar funções de associação de estímulos provenientes de diversas estruturas neocorticais e subcorticais, estando em posição única para realizar funções multisensoriais, processá-las e enviá-las de volta ao manto cortical e à algumas estruturas subcorticais.

⁷ Corante que pode ser injetado intracelularmente, permitindo mapear toda a estrutura anatômica das células.

1.3. Eletrofisiologia

1.3.1. Oscilações e ritmos cerebrais

As oscilações dos potenciais elétricos cerebrais em diferentes faixas de frequência, desde cerca de 0,5 até 300 Hz⁸ (ou mais) (BUZSÁKI; DRAGUHN, 2004; ENGEL; FRIES; SINGER, 2001; STERIADE, 2006), são tidas hoje como principal argumento a favor da idéia de que o cérebro não é um órgão passivo que recebe estímulos do ambiente e apenas organiza comportamentos adequados em resposta à estes estímulos. A coexistência e interação de diversos ritmos em complexos padrões oscilatórios mesmo em estados de “desconexão do mundo externo” ou inconsciência, como o sono, coma, anestesia geral e estados epiléticos de ausência mostram que a atividade cerebral é incessante e depende apenas parcialmente da entrada sensorial (LAUREYS, 2005; LAUREYS; OWEN; SCHIFF, 2004).

Estas oscilações se devem principalmente à somatória de potenciais pós-sinápticos excitatórios e inibitórios em dezenas, talvez centenas de células em dado momento (BUZSÁKI; LEUNG; VANDERWOLF, 1983; FUJITA; SATO, 1964; NUNEZ; GARCIAUSTT; BUNO, 1987) e podem ser medidas com eletrodos inseridos no espaço extracelular (potenciais de campo local) ou colocados superficialmente no escalpo (EEG). Assim sendo, estes registros se devem a um padrão local de atividade celular relacionado de maneira indireta aos disparos neuronais, pois apenas algumas das centenas de células, cujas variações de potencial são registradas por um dado eletrodo, irão atingir seus limiares de disparo de potencial de ação em dado momento. Além disso, a alta frequência dos disparos celulares (na ordem de kHz) permite discerni-los das oscilações mais lentas dos potenciais de campo local (abaixo de 1 kHz) por filtragem adequada do sinal registrado com eletrodos intracerebrais⁹.

Uma interpretação corrente, mesmo que simplista, é de que os potenciais de campo local refletem a entrada de estímulos no ponto registrado, dado que são somatórias de correntes

⁸ As frequências que compõe cada faixa variam entre espécies, sendo, porém, razoavelmente constante para cada espécie. A utilização de mesma nomenclatura para frequências distintas causa por vezes confusão entre a literatura de diferentes espécies.

⁹ Os disparos celulares não podem ser medidos por eletrodos no escalpo pois se atenuam fortemente pela distância e composição dos tecidos entre os eletrodos e as células.

dendríticas excitatórias e inibitórias, enquanto os disparos registrados extracelularmente são a saída de estímulos do ponto em que se está registrando, uma vez que são devidos ao potencial de ação emitido pelas células naquela região. A relação entre estas medidas pode então fornecer informações importantes sobre a comunicação neural entre distintos pontos do sistema nervoso central. Portanto, o estudo das oscilações extracelulares, ou potenciais de campo local, conjuntamente com o registro de disparos celulares, permite inferir a conectividade efetiva entre dois ou mais pontos distintos registrados simultaneamente e cujas conexões neuroanatômicas são conhecidas.

Com exceção de estados patológicos ou induzidos por fármacos (especialmente os anestésicos), as principais mudanças nas frequências dominantes em determinado momento e local do cérebro ocorrem durante o ciclo sono-vigília. Após os estudos iniciais com EEG e sono, em que se caracterizou a distinção do sono em pelo menos dois grandes estágios, o REM e o SOL (ASERINSKY; KLEITMAN, 1953; BERGER, 1929; DAVIS et al., 1937), as primeiras interpretações foram de que o SOL se tratava de um estado de redução drástica de atividade cerebral¹⁰ e conseqüente desconexão das aferências sensoriais, dada principalmente a predominância de oscilações corticais de baixa frequência que deram o nome a este estado (oscilações lentas, entre 0,5 e 1 Hz e também o ritmo delta, entre 1 e 4 Hz). Entretanto, já foi demonstrado que mesmo no SOL coexistem oscilações de frequências mais altas, como por exemplo o gama (30-100 Hz) (HUGHES, 2008; STERIADE, 2006). Estudos em animais experimentais também desafiaram a idéia de diminuição de atividade cerebral no SOL ao demonstrar aumento de disparos celulares em diversas regiões após experiências relevantes na vigília (RIBEIRO et al., 2004; WILSON; MCNAUGHTON, 1994).

Atualmente sabe-se que as oscilações lentas do SOL atuam como sincronizadoras da atividade dispersa em diversas áreas cerebrais, em especial nas alças tálamos-corticais e córtico-talâmicas (STERIADE, 2006). Deste modo, a sucessão lenta de estados despolarizados (UP states) com estados hiperpolarizados (DOWN states) sincronizadamente em diversas regiões facilita ou inibe, respectivamente, interações neurais em outros ritmos mais acelerados. Assim sendo, durante o ciclo sono-vigília o cérebro alternaria entre estados em que predominam as frequências teta e gama, diretamente relacionadas a estímulos externos originados no ambiente, e um estado de maior sincronia global caracterizado pelas subidas e descidas dos ritmos lentos. Entretanto, a predominância do teta no sono REM desafia novamente a idéia de que certas frequências seriam

¹⁰ Inclusive, na época pensava-se não haver sonhos durante esta fase, o que hoje sabe-se ser incorreto (STERIADE, 2006)

evocadas por estímulos sensoriais, pois neste estado não há somente desconexão sensorial, mas também inativação comportamental devido à atonia muscular.

Interessantemente, das diversas hipóteses levantadas para explicar as oscilações cerebrais durante o sono, a maioria trata da memória. Resumidamente, a idéia central (BORN; RASCH; GAIS, 2006; DIEKELMANN; BORN, 2010; RIBEIRO; NICOLELIS, 2004; STICKGOLD, 2006; TONONI; CIRELLI, 2006) é de que as relações entre diversas áreas cerebrais ativadas por estímulos sensoriais e eventos comportamentais subseqüentes após períodos de vigília são fortalecidas, armazenadas e consolidadas durante as oscilações nos ciclos sucessivos de SOL e REM, durante os quais não há a interferência de novos estímulos sensoriais, permitindo a livre reverberação dos eventos ocorridos na vigília.

1.3.2. Oscilações na rede córtico-hipocampal

No hipocampo, durante o ciclo sono-vigília observa-se a presença de ritmos oscilatórios com faixas de frequência características, sendo os principais os ritmos delta (1-4 Hz), teta (4-12 Hz), gama (40 – 120 Hz) e os ultra-rápidos “sharp-waves” e “ripples”¹¹ (em torno de 250 Hz ou mais), que ocorrem de maneira associada em CA3 e CA1, respectivamente (BATTAGLIA; SUTHERLAND; MCNAUGHTON, 2004; BRAGIN et al., 1995; BURGESS; O'KEEFE, 2005; BUZSÁKI, 1996; CHROBAK; BUZSÁKI, 1998; ISOMURA et al., 2006; TIMO-IARIA et al., 1970). Durante a vigília e o sono REM predominam o teta e o gama (GRASTYAN et al., 1959; VANDERWOLF, 1969), enquanto durante o SOL ocorrem as oscilações de baixa frequência (0,5 a 1 Hz), o delta e os ultra-rápidos sharp-waves e ripples. Durante períodos de imobilidade e comportamentos consumatórios também podem ser observadas estas oscilações rápidas, de maneira semelhante ao que ocorre no SOL.

1.3.2.1. O ritmo teta

Historicamente, o mais estudado dos ritmos hipocampais é o teta (BUZSÁKI; LEUNG; VANDERWOLF, 1983; KRAMIS; VANDERWOLF; BLAND, 1975; TIMO-IARIA et al., 1970;

¹¹ Os termos “sharp-waves” e “ripples” serão usados ao longo deste trabalho em seu original em inglês pois até o momento não há tradução corrente para o português.

VANDERWOLF, 1969; VINOGRADOVA, 2001), devido à sua imensa amplitude, presença em quase todos os estados comportamentais e estabilidade enquanto perdurar o comportamento em questão (BUZSÁKI, 2002). A amplitude do teta, especialmente durante estados de vigília ativa e no sono REM, é tão grande que chega a ser registrado até mesmo por eletrodos superficiais no neocórtex. Esta oscilação também ocorre numa faixa em que é facilmente detectável a olho nu em traçados simples¹², o que facilitou muito nas análises iniciais em épocas que os registros eram grafados em papel (HUGHES, 2008).

Diversos comportamentos foram correlacionados ao ritmo teta ao longo das décadas, tais como locomoção, exploração, atenção, resposta de orientação, movimentos voluntários e integração sensorio-motora (BASTIAANSEN; HAGOORT, 2003; BLAND; ODDIE, 2001; BUZSÁKI, 2002; 2005b; BUZSÁKI; LEUNG; VANDERWOLF, 1983; EGO-STENGEL; WILSON, 2007; HASSELMO, 2005; O'KEEFE; BURGESS, 2005; VANDERWOLF, 1969; VINOGRADOVA, 1995), indicando que uma vasta circuitaria está envolvida em sua geração e manutenção. Oscilações na frequência do teta foram observadas em diversos pontos das alças córtico-hipocâmpais, como subículo, córtex péri-rinal e cíngulo (BUZSÁKI, 2002; 2005b; LISMAN, 2005) e também no córtex entorrinal (MIZUSEKI et al., 2009). Este padrão está de acordo com uma teoria interessante sobre a função do teta em sincronizar a atividade em diversas estruturas neocorticais com o hipocampo, que processaria estas informações e as devolveria ao neocórtex (MILLER, 1989; 1991). De acordo com o trabalho original de Miller, o período do teta, cerca de 100 a 200 ms, é adequado para que um impulso originado no neocórtex, digamos em áreas pré-frontais, navegue por toda a circuitaria hipocâmpal e volte até a origem em uma única oscilação da rede (Figura 3).

Importante notar que o teta não é exatamente síncrono em todas as áreas do hipocampo e do neocórtex, mas que ocorrem atrasos e adiantamentos específicos a distintas regiões e estados comportamentais. Estas diferenças temporais podem ser medidas nos registros extracelulares principalmente como defasagens na fase¹³ da oscilação em diversos pontos. Marcantemente, o teta hipocâmpal possui um perfil característico conforme é registrado em diferentes profundidades,

¹² Cerca de sete picos por segundo são muito mais fáceis de identificar do que, por exemplo, os 40 a 100 do ritmo gama.

¹³ A fase de uma oscilação é a medida de quão distante se está, por exemplo, do pico. Ou seja, duas oscilações de mesma frequência podem variar no momento em que atingem o pico de cada ciclo (e por consequência também as demais posições do ciclo). Esta diferença pode ser representada em graus e reflete a relação temporal entre as duas oscilações. Diversos mecanismos de codificação neural foram atribuídos a defasagem de fase entre estruturas (BUZSÁKI; DRAGUHN, 2004) ou entre os disparos de algumas células e a oscilação do potencial de campo local (MASQUELIER et al., 2009). Relações de fase também podem existir entre frequências distintas (COLGIN et al., 2009).

correspondendo às diferentes camadas da estrutura laminar do hipocampo (BUZSÁKI, 2002; FORSTER; ZHAO; FROTSCHER, 2006; MONTGOMERY; BETANCUR, 2009; SHIRVALKAR; BAHAR, 2009).

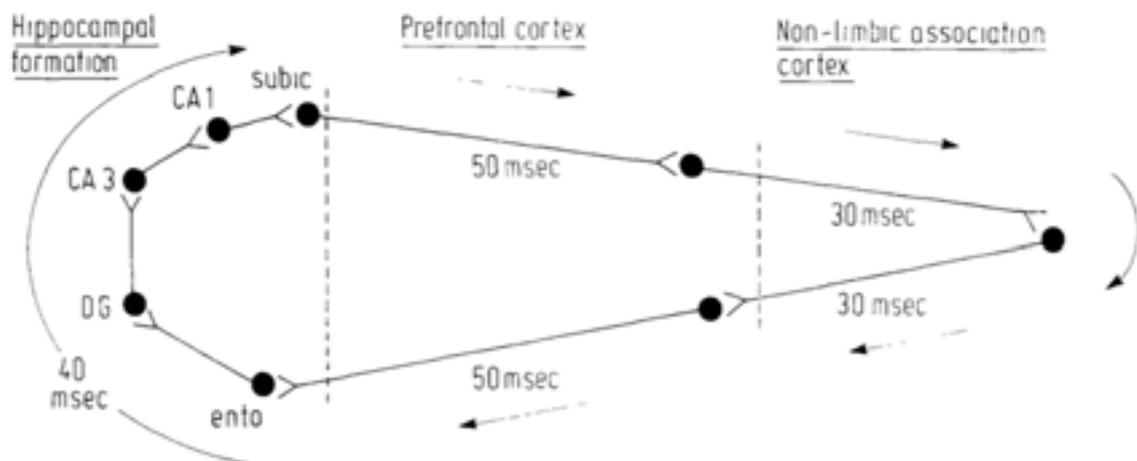


Figura 3 – Representação esquemática da circuitaria córtico-hipocampal, conforme publicação original (MILLER, 1989; 1991) reproduzida sob permissão do autor (ver seção 9.3, ANEXO C). Os tempos estimados de transmissão de impulsos a cada etapa são representados em milissegundos. O total levaria cerca de 200 ms, de acordo com o esquema. O autor enfatizou que as estimativas não eram precisas por se tratar de modelo teórico, mas que poderiam estar em excesso de aproximadamente 80 ms. O intervalo entre 120 e 200 ms corresponde ao período aproximado do ritmo teta hipocampal (4-10 Hz), o que revela de maneira clara a importância de oscilações neurais sincronizadas nesta frequência, permitindo a propagação de impulsos de áreas corticais pela circuitaria hipocampal e de volta a áreas corticais em apenas um único ciclo oscilatório da rede.

Em CA1, região onde o teta é mais intenso e foi mais investigado, ocorre uma inversão da fase do teta medido extracelularmente entre as camadas onde se localizam os dendritos basais e apicais. Esta inversão é de até 180 graus, revelando que há uma diferença de até meio ciclo da oscilação do ritmo teta entre essas regiões das células de CA1. Uma vez que projeções oriundas do CE terminam nas camadas apicais e que as aferências de CA3 fazem sinapse nas porções proximais da árvore dendrítica (ver seção 1.2), esta defasagem permite a regulação fina da interação de estímulos que trafegam por alças distintas no hipocampo, i.e., as vias temporoamônica e trissináptica, ambas terminando em CA1. Isto pode facilitar ou inibir disparos das células de CA1, de acordo com a fase em que se encontra a oscilação em CA1 no momento da chegada de cada estímulo, pois para o disparo de uma determinada célula pós-sináptica é necessária a somatória de potenciais pós-sinápticos desencadeados por transmissão de diversas células pré-sinápticas.

Entre CA3 e CA1 também há defasagem na oscilação do teta, especialmente durante uma tarefa de aprendizagem (MONTGOMERY; BETANCUR, 2009), corroborando a hipótese de que diferenças temporais sutis nas oscilações dos diversos pontos da rede constituem importante mecanismo de codificação neural da atividade proveniente do neocórtex e que representam os estímulos sensoriais que compõe o contexto comportamental.

Estes intervalos variados são importantes não somente para sincronizar aferências de CA3 e do CE que chegam em CA1, mas também para sincronizar o hipocampo com estruturas corticais cujos tempos de transmissão variam, pois se situam a distâncias diversas, com número de sinapses e tempos de condução axônica diferentes. Este sofisticado mecanismo oscilatório permite a formação temporária de diversas sub-redes que transmitem impulsos multisensoriais de todo o manto cortical para o hipocampo e novamente de volta ao neocórtex em poucos milissegundos (Figura 4).

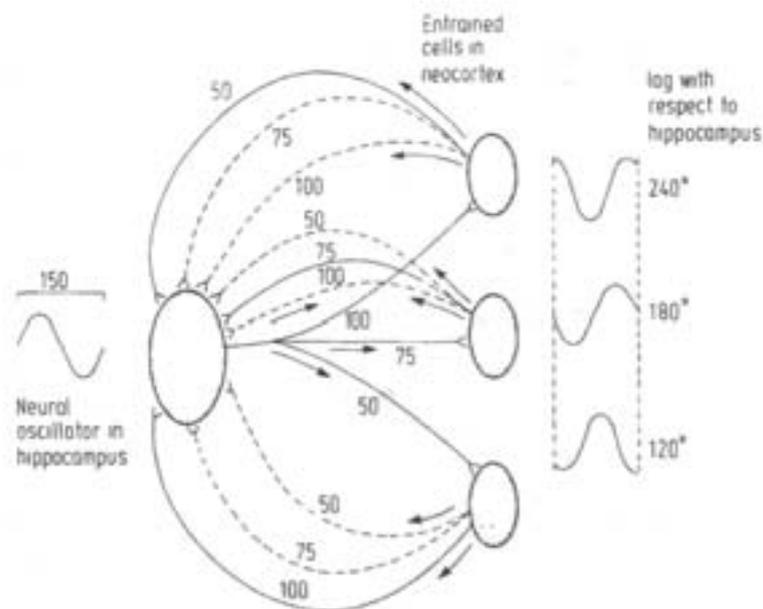


Figura 4 – Sincronização de diversas áreas neocorticais com o hipocampo, conforme publicação original (MILLER, 1989; 1991) reproduzida sob permissão do autor (ver seção 9.3, ANEXO C). O esquema representa diversas áreas neocorticais, à direita, com respectivos tempos de transmissão para e do hipocampo, em milissegundos. A defasagem, relacionada a estes diversos “atrasos”, está representada pelas senóides à direita, identificadas por “lag with respect to hippocampus”. As linhas sólidas representam áreas corticais que seriam sincronizadas ao ritmo hipocampal momentâneo, quando ambas regiões oscilarem com período de 150 ms (aprox. 6,7 Hz), por exemplo. Assim sendo, os impulsos podem transitar pela rede atingindo cada região no momento de máxima despolarização das células locais, aumentando a probabilidade de que as células pós-sinápticas atinjam o limiar de disparo e transmitam o impulso para o próximo ponto da rede.

Os trabalhos iniciais de Case Vanderwolf na década de 70 mostraram que o ritmo teta hipocampal podia ser farmacologicamente dividido em dois componentes, um sensível ao antagonista muscarínico atropina e outro resistente a esta manipulação. A injeção de atropina terminava completamente com a oscilação do teta em animais anestesiados, porém apenas mudava

o perfil laminar destas oscilações nos animais despertos (BUZSÁKI, 2002; BUZSÁKI et al., 1986; KRAMIS; VANDERWOLF; BLAND, 1975; VANDERWOLF, 1988). Outras publicações demonstraram que a remoção do CE ou a desconexão do hipocampo destas aferências abolia o teta resistente a atropina e tornava a oscilação remanescente sensível ao bloqueio colinérgico (BUZSÁKI, 2002; BUZSÁKI; LEUNG; VANDERWOLF, 1983). Assim sendo, propôs-se que o componente resistente a atropina estaria relacionado à atividade glutamatérgica oriunda das alças córtico-hipocampais, mais afetadas pelos anestésicos (BUZSÁKI, 2002; 2005b; GILLIES et al., 2002; KIRK; MACKAY, 2003), enquanto o componente sensível ao bloqueio colinérgico deveria ser gerado por outra circuitaria. Dada a grande quantidade de núcleos colinérgicos em estruturas subcorticais (JONES, 2005), foi gerada a hipótese de que o teta sensível a atropina estaria ligado à atividade neste sistema subcortical aferente ao hipocampo.

De fato, o ritmo teta também é registrado em estruturas subcorticais (BLAND; ODDIE, 2001; PAN; MCNAUGHTON, 2004), sendo a maioria delas aferentes ao hipocampo. Entre as principais aferências estão algumas estruturas consideradas geradoras ou marca-passo do teta, como o complexo formado pelo septo medial-núcleo da banda diagonal de Broca e o núcleo supramamilar do hipotálamo (KIRK; MACKAY, 2003; KIRK; MCNAUGHTON, 1991; KOCSIS, 2006; MANSEAU; DANIK; WILLIAMS, 2005; PAN; MCNAUGHTON, 2004; PETSCHKE; STUMPF; GOGOLAK, 1962; STUMPF; PETSCHKE; GOGOLAK, 1962). Uma vez que as projeções do septo medial-núcleo da banda diagonal de Broca são gabaérgicas e colinérgicas, fica fortalecida a hipótese de que esta é a via responsável pelo componente do teta sensível a atropina, o que de fato foi demonstrado por lesões seletivas no septo medial (LEE et al., 1994). Este sistema parece ser modulatório da atividade do ritmo teta resistente a atropina, já que os terminais colinérgicos no hipocampo terminam em CA3 e CA1 e a localização dos receptores muscarínicos coincide com os colaterais de Schaffer (LOPES DA SILVA et al., 1990).

Em contraste com esta projeção colinérgica mais difusa está a projeção do SuM para o septo medial e CA2, que ocorre por colaterais dos mesmos axônios (VERTES; MCKENNA, 2000), contém o neuropeptídeo substância P (BORHEGYI; LERANTH, 1997; KOWALL et al., 1993; VINCENT; MCGEER, 1981) e cujas terminações são específicas nas células piramidais (MAGLÓCZKY; ACSÁDY; FREUND, 1994). Este neuropeptídeo, em alguns casos, coexiste nos mesmos neurônios que liberam acetilcolina (VINCENT et al., 1983), sugerindo que CA2 seja um

centro gerador ou mantenedor de um ritmo teta dependente de atividade colinérgica e peptidérgica, parcialmente segregado do teta glutamatérgico das alças corticais.

Interessantemente, a substância P possui influências sobre o sono, tendo sido demonstrado que injeção i.c.v. deste neuropeptídeo diminui a quantidade de SOL e aumenta a quantidade de REM, a latência para dormir e o número de despertares (ANDERSEN et al., 2006). Estes resultados indicam que CA2 possua papel importante na regulação da circuitaria hipocampal tanto durante o SOL quanto durante o sono REM. Corrobora esta possibilidade o fato de que CA2 possui expressão aumentada de receptores adenosinérgicos A1 no adulto, que se localizam pós-sinápticamente nos dendritos e soma das mesmas células que recebem aferências do SuM (OCHIISHI et al., 1999). Durante a vigília ocorre acúmulo de adenosina no prosencéfalo basal, o que acompanha a sonolência, sendo que infusões de adenosina nesta região aumentam o tempo de sono de maneira dependente dos receptores A1 (BASHEER et al., 2001; STENBERG, 2007), que são acoplados a proteína G inibitória e podem diminuir a liberação de outros transmissores do terminal pré-sináptico (TAKAHASHI; PAMPLONA; PREDIGER, 2008). Estudos com acetilcolina e sono apontam nesta mesma direção ao demonstrar que o tônus colinérgico é alto durante a vigília exploratória e durante o sono REM, havendo drástica diminuição durante o SOL (JONES, 2005). Foi demonstrado inclusive que esta diminuição do tônus colinérgico durante o SOL é importante para a memória declarativa, mas não para memória implícita, indicando papel fundamental do hipocampo neste processo (GAIS; BORN, 2004). Assim sendo, CA2 parece ser um elo direto entre os sistemas subcorticais regulatórios do ciclo sono-vigília e o hipocampo, podendo influenciar os processos fisiológicos do hipocampo durante este ciclo, como as oscilações eletrofisiológicas e a consolidação de memórias.

Um modelo interessante para se estudar o teta em diferentes regiões e com diversas manipulações farmacológicas são os experimentos em fatias de hipocampo, que permitem infusões controladas e restritas a pequenas regiões, bem como registros localizados. Infusão de metacolina, agonista colinérgico, induz oscilações teta em CA3 e CA2, sendo as oscilações mais proeminentes em CA2, tendo sido sugerido que este campo e a porção adjacente de CA3 formem um centro gerador do teta colinérgico intrínseco ao hipocampo (FISCHER, 2004; FISCHER; DURR, 2003; FISCHER; GERSHWILER; THOMPSON, 1999). Registros realizados em CA1 em fatias evidenciaram, por outro lado, que a aplicação de agonistas glutamatérgicos, em especial dos receptores metabotrópicos, eliciam ritmo teta resistente a atropina. Recentemente, foi demonstrado

que até mesmo no hipocampo inteiro mantido isolado *in vitro* ocorrem oscilações na faixa do teta em CA1, sendo resistentes a atropina injetada nesta região (GOUTAGNY; JACKSON; WILLIAMS, 2009).

Coletivamente estes estudos indicam que há no mínimo dois sistemas parcialmente segregados que oscilam na faixa de frequência do ritmo teta e que são mediados por neurotransmissores distintos. De acordo com este modelo, o sistema córtico-hipocampal (CA1 e CA3) seria o responsável pelo ritmo teta mais acelerado mediado principalmente por interações glutamatérgicas, enquanto o sistema septo medial-SuM-hipocampo (CA2 e CA3) seria o responsável pelo teta um pouco mais lento mediado por complexas interações colinérgicas e peptidérgicas (em especial a substância P).

A interação destes dois sistemas foi minuciosamente estudada em fatias de hipocampo. Estimulação das fibras musgosas desencadeia resposta pós-sináptica em CA1 em dois momentos distintos, um após 9,0 e outro após 11,5 ms. Imageamento com corante sensível a voltagem mostrou que a resposta tardia em CA1 envolve ativação do campo CA2, enquanto a resposta rápida vai de CA3 direto a CA1. Assim sendo, um mesmo estímulo pode ativar alças distintas do corno de Ammon (SEKINO et al., 1997), potencialmente influenciando no efeito pós-sináptico em CA1, dado o intervalo muito curto (2,5 ms) entre as duas respostas. Mais evidências da participação de CA2 em alças hipocampais foram encontradas em animais anestesiados. Estimulação das aferências originadas no CE resultou em ativação concomitante do GD e CA2. A resposta em CA2 mostrou-se também composta por uma resposta rápida devido à conexão direta entre o CE e CA2 e uma resposta lenta, mediada por CA3 (BARTESAGHI; GESSI, 2004; BARTESAGHI; MIGLIORE; GESSI, 2006). Estes padrões de ativação seqüencial por alças distintas podem, *in vivo*, modular a eficiência de transmissão sináptica para células de CA1, pois a chegada seqüencial de estímulos possibilita a somatória de potenciais excitatórios pós-sinápticos, facilitando a ocorrência de disparos em CA1. Este mecanismo é dependente então das relações entre CA1, CA2 e CA3 durante as oscilações do ritmo teta, para que o tempo de disparo seja otimizado, permitindo a integração de impulsos originados no CE e que trafegam paralelamente pelas diversas alças do corno de Ammon.

1.3.2.2. O ritmo gama

Após a ênfase inicial no ritmo teta, originada de estudos nas décadas de 1960-1970 (KRAMIS; VANDERWOLF; BLAND, 1975; VANDERWOLF, 1969), novas pesquisas no hipocampo e também no neocórtex começaram a mudar o foco para oscilações mais rápidas, coletivamente chamadas de ritmo gama. Este ritmo compreende oscilações na faixa dos 40 até 110 Hz, com algumas variações, dependendo da espécie e autor dos estudos. O ritmo gama foi inicialmente estudado no córtex visual e gerou-se a hipótese de que estaria envolvido no processo de sensory binding, i.e., em conectar no tempo e espaço experiências sensoriais representadas por dispersas regiões do neocórtex (SINGER, 1993). Posteriormente o ritmo gama também foi relacionado a processos de memória (LISMAN; IDIART, 1995) e consciência (LLINÁS et al., 1998).

No hipocampo, o ritmo gama ocorre conjuntamente com o teta e é modulado por este (LISMAN; BUZSÁKI, 2008). O ritmo gama tem amplitude muito menor, sendo muito difícil identificá-lo visualmente em traçados, uma das prováveis razões pelas quais foram necessárias técnicas modernas de registro e análise para que pudesse ser detectado e estudado. Os possíveis mecanismos de oscilação rápida acima de 40 Hz no hipocampo envolvem redes de células inibitórias e conexões axo-axônicas por junções comunicantes (gap-junctions)¹⁴ (BENNETT; PEREDA, 2006; FISCHER, 2004; MANN; PAULSEN, 2005). Os interneurônios possuem padrão de disparo rápido por longos períodos, tendo sido demonstrado que são capazes de disparar continuamente a cada oscilação do ritmo gama (CSICSVARI et al., 2003), exercendo inibição cíclica sobre compartimentos específicos das células piramidais, e criando, portanto, janelas temporais nas quais pode ocorrer disparo sincronizado de redes localmente organizadas. Foi sugerido que o ritmo gama hipocampal tenha origem em CA3, devido à circuitaria recorrente, posteriormente propagando-se para CA1 e atuando como mecanismo de sincronização de disparo nestas duas áreas (CSICSVARI et al., 2003; MANN; PAULSEN, 2005). Entretanto, a possibilidade de que os interneurônios de CA2 participem do mecanismo do gama hipocampal não foi considerada. Esta hipótese é fortalecida pelo fato de que estas células projetam-se anterógrada e

¹⁴ As conexões diretas entre neurônios, sem a existência das sinapses com fendas separando as células, inicialmente proposta por Golgi e foi tema central do debate com Cajal no prêmio Nobel que dividiram em 1906. Após muita ênfase na “doutrina do neurônio” proposta por Cajal, as junções comunicantes e suas importantes funções reivindicam a teoria do sincício de Golgi, demonstrando que cada um dos pesquisadores tinha razão em suas observações.

retrogradamente para CA1 e CA3, respectivamente. Neste caso, CA2 seria importante não somente em articular interações no ritmo teta, mas também no gama.

1.3.2.3. Interações entre os mecanismos de geração dos ritmos teta e gama

A relação entre os ritmos teta e gama é proeminente nos mesmos estados em que o teta é prevalente, como na vigília ativa e no sono REM. Foi recentemente demonstrado que a comunicação nas alças hipocampais depende da interação entre estes dois ritmos e do estágio do ciclo sono-vigília. Em específico, a coerência encontrada entre o GD e CA3 foi maior no teta e gama durante o REM, enquanto a coerência entre CA3 e CA1 no gama diminuiu durante este mesmo estágio, implicando na ativação de alças hipocampais distintas durante o REM é mediada pelas oscilações rápidas do gama (MONTGOMERY; SIROTA; BUZSÁKI, 2008). Adicionalmente, foi demonstrado que o ritmo gama no corno de Ammon durante a vigília pode ser dividido em pelo menos duas faixas, uma lenta e uma rápida, ao redor de 40 e 90 Hz, respectivamente. Estas oscilações ocorrem em períodos e fases distintas do ritmo teta, sendo a oscilação lenta observada predominantemente na fase descendente, enquanto a rápida ocorre no vale da oscilação do teta (COLGIN et al., 2009). Corroborando a hipótese de que a interação teta-gama seleciona distintas alças córtico-hipocampais, os autores demonstraram alta coerência no gama lento (aprox. 40 Hz) entre CA3 e CA1 e no gama rápido entre o CE e CA1 (COLGIN et al., 2009). Isto sugere que oscilações rápidas (90 Hz) permitam comunicação direta pela via temporoamônica, entre CE e CA1, e oscilações mais lentas trafeguem preferencialmente pela via trissináptica. Isto pode ser de grande relevância por servir de mecanismo para segregação de impulsos potencialmente conflitantes que chegam em CA1, como por exemplo, novas informações provenientes do ambiente ou informações que estejam reverberando na circuitaria intrínseca do hipocampo. Uma vez que durante o sono REM ocorrem oscilações na faixa do teta e do gama e de que neste estado não há informações sensoriais provenientes do ambiente, uma hipótese interessante é que neste estágio as oscilações gama estejam diretamente relacionadas a processos mnemônicos de consolidação e plasticidade. Uma possibilidade interessante é que os interneurônios de CA2, por projetarem-se tanto para CA1 quanto para CA3, participem da sincronização celular na faixa do gama de maneira diferencial durante a vigília e o sono REM, o que até o presente momento não foi investigado. Estes interneurônios poderiam participar da seleção de alças hipocampais por interações do teta e gama e,

dessa forma, diferenciar os padrões de atividade durante a vigília e o sono REM, potencialmente mudando o estado da rede hipocampal de um modo de aquisição/evocação durante a vigília para consolidação durante o sono.

1.3.2.4. Disparos celulares e Plasticidade Sináptica

Os intervalos de tempo entre estímulos provenientes de diversas regiões do neocórtex, registrados como alterações na fase entre as oscilações do teta em diferentes pontos da alças córtico-hipocampais são importantes também na modulação da plasticidade sináptica. Isso fica evidente pelo fato de que a faixa de até meio período do teta, i.e., cerca de 100 ms (ou 180 graus), tem implicações na indução da LTP e da LTD (Long Term Potentiation e Long Term Depression)¹⁵ (MALENKA; BEAR, 2004), e também da plasticidade sináptica dependente do tempo de estímulos (Spike-Time Dependent Plasticity, STDP)¹⁶ (CAPORALE; DAN, 2008). A indução de LTP ou LTD depende não somente dos estímulos serem aplicado em alta ou baixa frequência, respectivamente, como inicialmente demonstrado, mas também da fase em que se encontra o ritmo teta local, sendo que LTP resulta de estímulos aplicados na fase positiva da oscilação e LTD pelos mesmos estímulos aplicados em oposição de fase (HOLSCHER; ANWYL; ROWAN, 1997; PAVLIDES et al., 1988). A relação entre estes fenômenos de plasticidade dependentes da fase do teta, experimentalmente induzidos, e os processos fisiológicos naturais do hipocampo foi evidenciada por estudo demonstrando que lentamente, ao longo de sete dias de aprendizagem, a fase do teta na qual ocorrem os disparos de CA1 muda, especificamente durante o sono REM (POE et al., 2000). Isto sugere que mecanismos endógenos semelhantes aos da plasticidade sináptica experimentalmente induzida estejam relacionados ao fortalecimento de circuitos córtico-hipocampais ativados de maneira síncrona durante eventos comportamentais relevantes. Outra evidência nesta linha vem do fato de que o intervalo de tempo em que ocorre LTP ou LTD durante a STDP é de cerca de 50 ms antes ou depois da despolarização pós-sináptica, o que novamente

¹⁵ Mecanismos de alteração da eficiência de transmissão sináptica entre células ativadas conjuntamente. Diversos protocolos experimentais de indução destes fenômenos são conhecidos hoje. No caso da LTP, as sinapses entre células coativadas passam por modificações moleculares e morfológicas que aumentam o impacto da célula pré-sináptica sobre a pós-sináptica em ativações subseqüentes do mesmo par. A LTD trata-se do oposto, de diminuição das forças sinápticas com posterior diminuição dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (MALENKA; BEAR, 2004).

¹⁶ A STDP é um mecanismo ainda mais fino de regulação da plasticidade sináptica. Em resumo, estímulos pré-sinápticos que precedem a despolarização da célula pós-sináptica geram LTP, enquanto que estímulos pré-sinápticos que chegam apenas alguns milissegundos após a despolarização pós-sináptica (cerca de 50 ms) induzem a LTD (CAPORALE; DAN, 2008).

coincide com o período de 100 ms de cerca de meio-ciclo do teta hipocampal (CAPORALE; DAN, 2008).

O ritmo gama, com período mais curto, de 10 até 25 ms (100 até 40 Hz, respectivamente), foi também proposto como possível mecanismo de regulação mais fina das janelas temporais para indução da plasticidade sináptica. Corroboram esta hipótese estudos demonstrando que células nas alças córtico-hipocampais possuem relação de fase com o gama (COLGIN et al., 2009; CSICSVARI et al., 2003).

Estes fenômenos de alterações na força de transmissão sináptica após coativação temporalmente precisa são tidos como os mecanismos celulares capazes de explicar a formação e consolidação das memórias (BAUDRY; LYNCH, 2001; CRAVER, 2003; IZQUIERDO; MEDINA, 1995; KIM; LINDEN, 2007; LEVY; STEWARD, 1979; MALENKA; BEAR, 2004; MORRIS et al., 2003; WHITLOCK et al., 2006), em concordância com a teoria das redes neurais¹⁷ (cell assemblies) proposta por Hebb (HEBB, 1949; NICOLELIS; FANSELOW; GHAZANFAR, 1997). A idéia central é de que circuitos ativados por determinadas experiências sensoriais-comportamentais são armazenados de maneira distribuída em uma rede neural cuja reativação subsequente é facilitada pelo fortalecimento das sinapses ativadas no momento da experiência comportamental. Assim sendo, durante a ativação inicial a informação é registrada na rede (correspondendo à aquisição de memórias) pelos mecanismos de potenciação/despotenciação sináptica de locais ativados ou não pelos estímulos relevantes do evento em questão. Esta informação é então fortalecida (a consolidação das memórias) na posterior atividade das redes previamente potencializadas, e pode então ser reativada com maior facilidade (evocação das memórias). A LTP foi inicialmente registrada justamente na circuitaria trissináptica, entre o GD e CA3 do gato (BLISS; LOMO, 1970), sendo que o elo entre este mecanismo de plasticidade e a memória se evidencia principalmente pelas fortes correlações farmacológicas com os processos de aquisição e consolidação da memória (IZQUIERDO; MEDINA, 1995). Além disso, as alterações fisiológicas observadas após a aprendizagem são as mesmas observadas após indução experimental da LTP, não sendo possível induzir LTP em locais previamente potencializados pela aprendizagem (WHITLOCK et al., 2006). A plasticidade sináptica ocorre em diversas regiões da circuitaria

¹⁷ Não confundir com o uso atualmente em voga para modelos artificiais e computacionais.

córtico-hipocampal, como por exemplo no CE (WOHRL; VON HAEBLER; HEINEMANN, 2007), subículo (O'MARA et al., 2001), córtex péri-rinal e pós-rinal (COUSENS; OTTO, 1998), bem como nas sinapses entre GD e CA3 (BORTOLOTTI et al., 2005; KAWAMURA et al., 2004; TONG; MALENKA; NICOLL, 1996) e entre CA3 e CA1 (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; KAWAMURA et al., 2004), coincidindo com as estruturas que oscilam na frequência do teta. A indução experimental de LTP no hipocampo ativa uma série de processos bioquímicos intracelulares que se propaga por esta circuitaria córtico-hipocampal ao longo de sucessivos episódios de sono REM (RIBEIRO et al., 2002), sugerindo que atividade gerada no hipocampo se espalhe por diversas regiões corticais por mecanismos semelhantes à LTP experimentalmente induzida. Levando em consideração a predominância do teta na vigília (ou seja, durante a aquisição/evocação) e no REM (i.e., durante a consolidação) e a localização de CA2 no meio das alças hipocampais, surgiu a importante questão de qual o papel de CA2 nestes processos de plasticidade relacionada ao ritmo teta. Surpreendentemente, um estudo recente com indução de plasticidade sináptica (LTP e LTD) em fatias de hipocampo de roedores mostrou que CA2 é muito resistente à indução destes fenômenos, se comparado a CA1 e CA3 (ZHAO et al., 2007). Infelizmente, dentre os vários protocolos disponíveis para estimular plasticidade na circuitaria hipocampal, neste estudo não foi testada a estimulação na frequência do ritmo teta (theta burst stimulation), que sabidamente causa a LTP em CA1 e CA3. Portanto, resta em aberto a importante questão se CA2 é resistente a plasticidade sináptica de maneira geral ou se a plasticidade neste campo se restringe à estímulos aplicados na faixa de frequência do teta. Ainda assim, este resultado inovador parece explicar uma série de estudos anteriores com quantificação de diversas moléculas no hipocampo, que de maneira geral mostravam uma especificidade bioquímica em CA2, de função fisiológica até então desconhecida. De acordo com os autores existe em CA2 uma “conspiração molecular contra a plasticidade”. Em 2009, o mesmo grupo demonstrou que a resistência a indução de plasticidade em CA2 se deve principalmente a diferenças no metabolismo intracelular de cálcio (SIMONS et al., 2009), corroborando os fatos anteriores sobre especificidade bioquímica e molecular em CA2 e a idéia de que estas peculiaridades estão envolvidas na resistência desta área a indução de LTP e LTD. Dentre as características bioquímicas, morfológicas e moleculares específicas em CA2, foi demonstrado: aumento de receptores adenosinérgicos A1 (OCHIISHI et al., 1999), que estão envolvidos com inibição da LTP (ARAI; KESSLER; LYNCH, 1990; DE MENDONÇA; RIBEIRO, 1990) e da transmissão sináptica em geral (MITCHELL; MILLER; DUNWIDDIE, 1993); maior concentração de proteínas da matriz extracelular (BRUCKNER et al., 2003; YAMAMOTO et al., 1988), que estão relacionadas à plasticidade sináptica (PIZZORUSSO

et al., 2002); maior densidade de oligodendrócitos (BERGER; FROTSCHER, 1994); aumento na expressão de striatal enriched tyrosine phosphatase (STEP) (BOULANGER et al., 1995), uma fosfatase capaz de desfosforilar e inativar a extracellular signal-regulated kinase (ERK) após ativação de receptores NMDA (PAUL et al., 2003), o que previne a indução de LTP (PELKEY et al., 2002); células piramidais contendo calbindina, proteína ligante de cálcio geralmente encontrada apenas em interneurônios (TÓTH; FREUND, 1992) e ausência da subunidade $\beta 5$ das integrinas (PINKSTAFF et al., 1999), moléculas que podem ser críticas na manutenção da LTP (KRAMAR et al., 2006).

Portanto, algumas das especificidades bioquímicas em CA2 envolvidas com a resistência à plasticidade sináptica são as mesmas que sugerem elo entre CA2 e a regulação do ciclo sono-vigília, como a transmissão via substância P e receptores A1 de adenosina. Estes resultados sugerem então que CA2 seja um importante centro modulador da atividade eletro-oscilográfica hipocampal, com potencial influência na regulação das distintas frequências oscilatórias ao longo do ciclo sono-vigília e conseqüente influência sobre os processos de plasticidade nos demais campos do corno de Ammon, provavelmente via interações nas bandas teta e gama, como sugerido por estudo com caracterização eletrofisiológica dos padrões de disparo de interneurônios em CA2 (MERCER; TRIGG; THOMSON, 2007). A minoria destes interneurônios, que está restrita ao próprio campo CA2, possui perfil de disparos rápidos semelhante aos interneurônios de CA1, enquanto a segunda categoria, que se estende por todos os CAs exibe frequência de disparo adaptativa e uma resposta lenta à hiperpolarização. Assim sendo, estas classes distintas de células poderiam modular o gama e o teta, respectivamente.

Tomados de maneira conjunta, os resultados prévios indicam que CA2 possa modular de maneira precisa as oscilações, disparos celulares e mecanismos de plasticidade sináptica de maneira anterógrada e retrógrada, influenciando assim a transmissão de impulsos pelo hipocampo e exercendo papel importante em suas funções.

2. Objetivos

“Your goal is always just a few yards ahead, rather than right up there”

John Lennon

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os padrões de atividade eletrofisiológica em CA3, CA2 e CA1 em ambos os hemisférios cerebrais durante o ciclo sono-vigília do rato Wistar, com ênfase especial nos ritmos teta e gama.

2.2. Objetivos específicos

Para realização do objetivo geral foi necessário realizar diversas etapas de desenvolvimento técnico-científico, como planejar, construir, testar e implantar matrizes de microeletrodos que permitissem registrar as três áreas do corno de Ammon simultaneamente; desenvolver métodos histológicos para localização dos eletrodos e testar, adaptar e desenvolver técnicas de análise dos sinais coletados.

3. Métodos

“Try, just a little bit harder”

Janis Joplin

“O cérebro não colhe idéias no canteiro do ócio. É sobretudo pela interação com o material, pelo trabalho, pelo esforço e, em última instância, pelo fracasso, que nós nutrimos nosso banco de idéias”

Vick Muniz

3.1. Aspectos Éticos

Para a realização deste trabalho foi necessário o uso de animais de experimentação. Foram seriamente consideradas as questões éticas do uso de animais para experimentos científicos. Todos os protocolos empregados foram previamente aprovados e autorizados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo 1094/06, Anexo A) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras do Hospital Sírio Libanês (CEUA2006/19, 9.2. Anexo B). Os protocolos adotados também estão em acordo com a Lei Arouca, aprovada durante a execução deste trabalho (Lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008).

3.2. Animais

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos, provenientes do CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP. Os animais foram adquiridos com cerca de dois meses de idade e 230 g. Foram transferidos ao biotério do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês (IEP-HSL) por transporte especializado. Ao chegarem foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12/12 horas (período claro começando às 07:00), com livre acesso ao alimento e água, permanecendo sem qualquer manipulação por três dias para aclimação ao novo ambiente. Após este período começaram a ser manipulados para habituação ao experimentador e às condições experimentais.

3.3. Eletrodos

Para a construção das matrizes de microeletrodos foram utilizados fios de tungstênio revestidos com Teflon, 50 µm de diâmetro (California Fine Wire – CFW). Os fios foram cuidadosamente afiados com tesoura, um a um, estendendo-os sobre madeira com uma fenda para encaixe de uma das lâminas da tesoura. Segurando firmemente nas duas pontas do fio, para evitar que entorte ao ser cortado, cortou-se em ângulo agudo para formação de uma ponta semelhante a um bisel de agulha. Posteriormente, foi construído um molde em papel perfurado de acordo com planejamento realizado para a estrutura anatômica do hipocampo dorsal do rato utilizando o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2007). Para a construção do molde foi utilizado equipamento específico, constituído por uma base fixa transladável, com dois eixos com precisão micrométrica (XY Translation Stage Model 401, Newport, Irvine, CA, EUA) e uma furadeira de alta precisão (Servo Products Company Model 7000) com broca de cobalto de 0,7 mm de diâmetro na ponta (Titex Plus, Alemanha). Os fios foram então colocados no molde um a um, passando-os por duas folhas de papel perfuradas, mantidas paralelas entre si. Após o ajuste de todos os 32 fios em suas posições, o feixe foi colado com cola epóxi tornando-se firme e estável, sem que os fios pudessem mover-se entre si.

Paralelamente, uma placa plástica com trilhas metálicas condutivas para 32 fios, feitas sob encomenda (Printed Circuit Boards - PCBoards) foi soldada a um micro-conector (Omnetics[®]) a ser fixado na cabeça do animal (NICOLELIS et al., 2003). Cada um dos 32 pontos de solda foi testado com auxílio de um multímetro, para confirmar a passagem de corrente em todos e a inexistência de curto-circuito entre quaisquer pontos.

O feixe de fios foi então cuidadosamente posicionado sobre a placa plástica, onde foi colado na posição desejada com cola de cianoacrilato. Sob visualização ao microscópio, cada um dos fios foi inserido em seu respectivo local da placa. Os fios foram então cortados e desencapados um a um na ponta a ser conectada à placa com tinta metálica condutiva (High Purity Silver Paint, SPI Supplies), criando um circuito condutivo desde as pontas a serem implantadas no cérebro e os 32 pontos machos do conector a ser fixado na cabeça do animal, que podem então ser conectados ao cabo durante as sessões de registro, ficando o animal livre nos demais momentos. Após a conexão do feixe a ser implantado, a matriz recebe o fio terra, que é soldado no local adequado da placa plástica, onde situa-se sua trilha metálica.

Após montada e conectada à placa com tinta condutiva, a passagem de corrente por cada um dos 32 fios da matriz é verificada inserindo-se os fios em água e passando-se corrente, canal por canal, a partir do respectivo pino macho do conector. Pode-se observar pequenas bolhas de ar formando-se ao redor da ponta do fio ligado ao respectivo canal do conector. Este processo permite conferir se todos os fios estão conectados aos canais planejados e se não há curto-circuito na matriz. Após o teste em água a matriz é toda selada e protegida com cola epóxi, restando exposta apenas a pequena parte a ser inserida no cérebro durante a cirurgia. A impedância final de cada eletrodo é de cerca de 1,0 MΩ a 1,0 kHz.

3.4. Procedimentos Cirúrgicos

3.4.1. Anestesia

Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg) i.m. após indução inalatória com halotano (5% em O₂ por 3 min seguido de manutenção com 2% pelo tempo que fosse necessário). Atropina (0,1 mg/kg) i.m. foi injetada logo após a anestesia inicial para evitar arritmia cardíaca e salivação excessiva. Para suplementação durante o procedimento cirúrgico, doses adicionais de cetamina i.m. foram administradas alternando entre as patas traseiras, sempre que necessário de acordo com os seguintes critérios: a) tensão na cauda, b) movimentação de vibrissas, c) movimentação de patas. Em poucos casos em que se notou tensão muscular excessiva após 4 a 6 horas da anestesia inicial utilizou-se suplementação com dose muito pequena de xilazina (0,1 mg/kg).

3.4.2. Cirurgia

Após verificação do estado anestésico inicial por pinçada na pata traseira sem que ocorresse retirada da mesma, e da cauda sem que houvesse qualquer reflexo, os animais foram inteiramente limpos com álcool 70%, secos com ar pressurizado e tricotomizados na região da cabeça, cuidando-se para preservar as vibrissas. Em seguida foram colocados no aparelho estereotáxico para início da cirurgia, de acordo com o seguinte protocolo: limpeza da pele na região da cabeça com solução iodada (Povidine) e álcool 70%, seguido de injeção subcutânea de anestésico local e vasoconstritor

(lidocaína com xilestesina). Proteção ocular com pomada oftálmica (Epitezan[®]) e gel hidratante (KY[®]), com posterior cobertura com gaze. Incisão na pele, da altura dos olhos até a altura das orelhas. Retirada do perióstio e leve raspagem do crânio. Pequenos sangramentos no crânio foram contidos por leve raspagem adicional. Se necessário, foram estancados por cauterização rápida. Hidratação da musculatura e pele com gel hidratante. Marcação das janelas para implante das matrizes e pontos para parafusos de sustentação e aterramento utilizando-se as coordenadas estereotáticas definidas na construção das matrizes (ver seção 4.1.2.6). Realização de pequenos orifícios no crânio para fixação de parafusos de sustentação e aterramento (quatro para implantes unilaterais, três para implantes bilaterais). Em seguida, realiza-se lentamente a abertura da janela para o(s) implante(s). Toma-se cuidado para não superaquecer o local, portanto realizando-se o corte da janela em etapas espaçadas por alguns minutos. Para não danificar a dura-máter e para que não haja entrada de detritos no tecido nervoso, o corte das janelas é feito mais lentamente quanto mais próximo do fim, conforme pôde-se observar pela transparência da fina camada restante de osso. Após craniotomia em ambos os lados e limpeza da área com solução fisiológica, o lado direito é protegido com salina, espuma absorvível (Gelfoam[®] Gelatina Absorvível, Pharmacia) e gel-hidratante (KY[®]). A dura-máter é retirada no local do implante com auxílio de uma pinça para cirurgias oftalmológicas e agulhas levemente entortadas para formar pinças descartáveis. Após a lenta e cuidadosa retirada da dura-máter, para que não haja rompimento de vasos, a matriz é então rapidamente posicionada para evitar protrusão tecidual devido à pressão interna na caixa craniana. Em seguida a matriz é lentamente inserida, com velocidade variando entre 1,25 e 2,5 $\mu\text{m/s}$, com auxílio de um micro manipulador hidráulico (David Kopf Instruments[®] Modelo 650). Quando a matriz atinge a posição final, os arredores dos eletrodos são protegidos com espuma absorvível. A fixação do conector ao crânio é realizada com cola cianoacrilato preta. Aterra-se a matriz nos parafusos de suporte com tinta condutiva. O mesmo protocolo é então utilizado para o implante no hemisfério contralateral. Ao término da cirurgia, solução fisiológica (NaCl 0,9%, 3 mL) foi injetada i.p. para reidratação, massageando-se o ventre do animal para melhor absorção. Logo após despertarem, os animais foram tratados com 3 mL de analgésico via oral (Paracetamol - Tylenol Criança[®], Janssen-Cilag) e mantidos em observação por 24 horas. No dia seguinte cada animal foi alojado individualmente no biotério, onde permaneceu em repouso por dez dias e durante o restante do período entre experimentos.

3.5. Registro comportamental e eletrofisiológico

Os experimentos foram conduzidos em uma caixa de madeira de dimensões internas 36 x 36 x 33 cm (comprimento x largura x altura) revestida com MDF preto. Esta caixa foi colocada dentro de uma gaiola de Faraday, para isolamento elétrico e acústico.

Os animais foram filmados por câmera de vídeo (Panasonic wv-BP334) conectada a sistema digital de aquisição de imagens (Ethovision XT[®], Noldus Information Technology) durante as duas horas de duração dos experimentos de registro. Um LED (Light-Emitting Diode) vermelho posicionado no canto da caixa comportamental era acionado manualmente, cinco vezes a cada 30 minutos, enviando simultaneamente pulsos TTL (Transistor-Transistor Logic) para o sistema de registro eletrofisiológico, permitindo sincronizar os sinais registrados ao vídeo comportamental.

Devido ao pequeno tamanho dos conectores utilizados, para a conexão destes ao cabo de registro os animais foram anestesiados com halotano (5% em O₂ por 3 min seguido de 2% para manutenção, pelo período necessário em cada caso). Após o animal recuperar sua movimentação normal, cerca de 5 minutos após os primeiros movimentos, esperou-se uma hora para evitar efeitos do halotano no sinal eletrofisiológico (NISHIKAWA; MACIVER, 2000). Para o registro foi utilizado um Multi-Channel Acquisition Processor (MAP[®]) da Plexon Inc. (Dallas, Texas, EUA) com os programas Plexon Server[®] (v. 2.5.2, de 23 de janeiro de 2008, versão HLK2/MXI), SortClient[®] (v. 2.5.2, de 23 de Janeiro de 2008) e OffLineSorter[®] (v. 2.8.3, 6 de Junho de 2006), da mesma empresa¹⁸. Entre o cabo de registro e o capacete do animal foi utilizado um pré-amplificador (Plexon Headstage 0.8 Hz VLSI AC Coupled, impedância de entrada 22 M Ω a 1 kHz). Os sinais de potencial de campo local foram digitalizados a 1 kHz e filtrados analogicamente com um filtro passa-alto de dois pólos a 0,7 Hz e um passa-baixo de quatro pólos a 170 Hz. Os sinais de disparos multi-unitários foram digitalizados a 40 kHz, filtrados analogicamente com filtro passa-alto de 0,22 μ F, 47k Ω a 154 Hz, passa-baixo de 1 μ F 180 Ω a 8,8kHz e digitalmente com um passa alto de dois

¹⁸ Versões mais atuais utilizadas. No início do projeto foram utilizadas versões anteriores.

pólos a 250 Hz. Após o final de cada sessão os animais foram novamente anestesiados com halotano para desconectar o cabo de registro do capacete.

Os animais utilizados na última etapa (n=3), i.e., registro do hipocampo durante o ciclo sono-vigília, foram registrados durante duas horas, por cinco dias consecutivos. Para evitar variações devido ao ritmo circadiano, todos os registros foram realizados durante a fase clara do ciclo do animal, entre as 13:00 e 16:00 h.

3.5.1. Análise de sinais

Os dados de potenciais de campo local foram diretamente importados em Matlab[®] (v. 7.6.0 R2008a). Os dados de disparos multi-unitários foram reanalisados utilizando-se o programa Offline Sorter[®] (Plexon Inc.) para ajuste da classificação de disparos (Spike Sorting, ver seção 4.5.2.1) e posteriormente importados em Matlab[®], utilizando funções em Matlab[®] fornecidas pela Plexon Inc. Os disparos multiunitários foram classificados em unidades estatísticas que potencialmente correspondem a neurônios distintos. Para isso realizou-se inspeção visual do formato dos disparos (Template Matching) conjuntamente com a técnica de Análise de Componentes Principais (ACP). Dado que cada célula dispara potenciais com amplitude, duração e formato específicos, é possível agrupar os disparos registrados em um mesmo eletrodo como sendo de potenciais células distintas. A ACP reduz a dimensionalidade ao calcular os componentes estatísticos responsáveis pela maior parte da variabilidade. Em geral, os três primeiros componentes, ortogonais entre si, explicam 95% da variabilidade. Assim sendo, ao grafar no espaço bidimensional dos primeiros dois componentes, ou tridimensional dos primeiros três, pode-se observar cada disparo como um ponto no espaço definido pelo(s) plano(s) dos componentes utilizados. Disparos semelhantes formam nuvens de pontos que se separam de disparos distintos, e cada nuvem corresponde então a uma unidade. Somase a estas duas avaliações, para melhor classificar os disparos como sendo de potenciais células distintas, o intervalo entre disparos. Sabe-se que neurônios apresentam um período refratário, ou seja, um pequeno intervalo de tempo após um disparo de potencial de ação, no qual não podem disparar novamente, devido principalmente a mecanismos de inativação temporária de canais iônicos após a grande despolarização do potencial de ação. O intervalo entre disparos diversos registrados com um determinado eletrodo é então utilizado conjuntamente à observação do formato da onda e dos resultados da ACP para identificar disparos que não podem ser atribuídos a uma mesma célula pois os intervalos são menores que o período refratário (1 ms). Para cada unidade

registrada foi calculada: a taxa de disparo; a quantidade de salvas (bursts); o número de disparos por salva; a razão salvas/disparos simples e o intervalo médio entre disparos.

Os dados foram analisados em Matlab[®] utilizando-se uma combinação de funções padrão de Matlab[®], rotinas escritas no laboratório e rotinas disponíveis na internet. Em especial, utilizou-se o programa EEGLab (DELORME; MAKEIG, 2004; SCCN, 2008) para a Análise de Componentes Independentes (ACI, algoritmo runICA) e para remoção de trechos dos registros de potencial de campo local por inspeção visual (ver seção 4.5.1) e do pacote Chronux (MITRA; BOKIL, 2008) para parte das análises espectrais.

Para remoção do ruído de movimento, foi aplicada ACI nos dados de potenciais de campo local a cada 30 minutos de registro. A ACI decompõe o sinal de um conjunto de canais em componentes estatisticamente independentes. Como o ruído é independente dos padrões fisiológicos, esta análise tem sido utilizada para esta finalidade, com sucesso, por diversos pesquisadores. Os resultados da ACI foram inspecionados observando-se o traçado de cada um dos componentes e também o respectivo espectrograma.

Componentes contendo ruído, visualmente identificável como traçados irregulares de enorme amplitude quando comparado aos valores fisiológicos nos traçados e também no espectrograma, como faixas verticais de alta potência em diversas frequências, foram removidos. Os dados foram então novamente inspecionados para detecção de trechos remanescentes com problemas.

Como a ACI foi aplicada a cada 30 min de registro separadamente (pois o processamento requer muita memória RAM do computador), algumas diferenças foram observadas entre os trechos. Para evitar influências deste efeito no resultado final, analisamos apenas um trecho de 30 minutos por animal (Ver Apêndice C), selecionando o que continha maior tempo de registro tanto no SOL quanto no sono REM.

Cálculos de espectro de potência e coerência foram realizados em janelas de 10 s usando modelo Autorregressivo Vetorial (LÜTKEPOHL, 1993) de ordem 25 com programa desenvolvido em Python XY (Carlos Stein - Mestrado USP, em andamento).

3.6. Classificação do ciclo sono-vigília

O estagiamento do ciclo sono-vigília foi realizado visualmente, comparando-se os traçados dos potenciais de campo local, os espectrogramas e o vídeo do comportamento do animal. Os estágios de vigília ativa, quieta e autolimpeza (“grooming”) podem ser bem discriminados pelo vídeo. Adotou-se critério bem rigoroso para distinguir vigília ativa de quieta, sendo a ativa aquela com qualquer movimentação do animal, com exceção de breves e lentos movimentos de cabeça. A vigília ativa engloba portanto todos os comportamentos exploratórios, como caminhar, levantar, apoiar na parede, farejar etc. A vigília quieta corresponde a períodos de imobilidade ou de pouco movimento, com alguns movimentos breves e lentos da cabeça. O comportamento de autolimpeza, no rato, é bem característico no vídeo, sendo que o animal esfrega patas dianteiras na face e cabeça, lambe o corpo e coça com as patas traseiras repetidamente. Pelo vídeo também é possível discriminar bem os estágios de sono dos de vigília, pois nos estágios de sono o animal encontra-se deitado, de olhos fechados e geralmente imóvel. Entretanto, o vídeo não permite discriminar os estágios de sono de ondas lentas, sono REM e sonolência. Estes três estágios são mais bem discriminados pela inspeção visual do traçado de potenciais de campo local e espectrogramas simultaneamente com a observação do vídeo. Utilizando-se estas três informações, pode-se discriminar o sono de ondas lentas de todos os outros estágios pela presença marcante de ondas de alta amplitude e frequências variadas, facilmente identificáveis tanto no traçado quanto no espectrograma. O estágio de sono REM pode ser identificado utilizando-se em conjunto as três medidas, pois caracteriza-se por períodos de imobilidade com presença marcante de ondas teta no traçado e no espectrograma. Especificamente, entre o REM e a vigília ativa, difere o comportamento do animal, imóvel e deitado num caso e com muita movimentação no outro, e também porque no REM observa-se quase que exclusividade do ritmo teta, sendo que na vigília ativa observam-se também oscilações de baixa frequência. Por fim, o estágio de sonolência foi classificado como um período breve de transição entre a vigília quieta e o sono de ondas lentas. Neste estágio, o animal encontra-se totalmente imóvel, mas com traçado dos potenciais de campo local de amplitude intermediária, isto é, ainda não é observada a característica marcante do sono de ondas lentas, os potenciais de alta amplitude, mas tampouco se assemelha ao perfil da vigília quieta.

3.7. Eutanásia e Perfusão

Para verificar se as matrizes foram implantadas corretamente, um dia após o último registro, os animais foram profundamente anestesiados com halotano (5% em O₂) seguido de dose letal de cetamina i.p. (300 mg/kg) para perfusão transcardíaca. Apenas após observação de anestesia profunda por fortes pinçadas na cauda, patas e externo, sem que se observe qualquer reação do animal, a perfusão foi iniciada com injeção i.p. de 0,1 mL de heparina (100 UI/mL) para evitar coagulação sanguínea durante o processo. Em casos em que o animal demonstrou qualquer sensibilidade, foram aguardados 5 minutos e caso a resposta tenha persistido, dose adicional de anestésico foi aplicada e o procedimento repetido. O tórax foi então aberto com tesoura de pontas arredondadas e uma agulha foi inserida no ventrículo esquerdo. Com uma tesoura pontiaguda realizou-se leve corte no átrio direito e o animal foi então perfundido com 300 mL de tampão fosfato-salina a 36 °C em pH 7,4, seguido de 300 mL de solução de sulfeto de enxofre (Na₂S) a 0,1% tamponado a pH 7,4 a 4 °C e por fim 300 mL de solução de paraformaldeído 4% tamponado em pH 7,4, a 4%. A perfusão com solução fisiológica tamponada a temperatura ambiente destina-se a remover o sangue preservando ao máximo a estrutura dos vasos sanguíneos. A solução contendo sulfeto de enxofre é necessária para a coloração de Neo-Timm e o paraformaldeído para preservação do tecido (ver seção 3.8 Histologia). Após finalização da perfusão o animal foi decapitado e o encéfalo cuidadosamente extraído pelo palato, para evitar danos na região do implante. O encéfalo e o crânio com as matrizes foram então cuidadosamente fotografados. O encéfalo foi lavado em tampão fosfato-salina a 4 °C por 24 horas, desidratado em solução de sacarose 20% a 4 °C até que afundasse (aproximadamente 48 h) e então finalmente congelado a -80 °C para posterior corte em criostato. O crânio foi armazenado em recipiente plástico e mantido a 4 °C em geladeira.

3.8. Histologia

3.8.1. Cortes em criostato

Os encéfalos congelados em gelo-seco foram transportados até o departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), que gentilmente cedeu o criostato para a realização destes experimentos. O encéfalo foi cuidadosamente retirado do gelo-seco (- 80 °C) e imediatamente inserido no criostato (- 20 °C). Em seguida esperou-se 10 minutos para aclimatação. Após este intervalo, a base da medula e do cerebelo foram cortados com bisturi para aplainar a superfície a ser colada ao suporte do criostato. O encéfalo foi fixado à base do suporte com cola especial para tecidos (Tissue-Tek[®]) e então cortado seqüencialmente em fatias de 50µm de espessura. As partes frontais ao hipocampo foram utilizadas para alinhamento do encéfalo nos eixos DV, ML e AP. A partir do ponto em que os ventrículos laterais se unem, todos os cortes foram coletados até o final da região de implante, totalizando 72 cortes dispostos em 12 lâminas para cada animal. Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e mantidas a temperatura ambiente até o momento da coloração, realizada no Laboratório Cesar Timo-Iaria.

3.8.2. Coloração

Para localização precisa dos fios nas subáreas do hipocampo foram testadas duas colorações e combinações entre elas: Coloração de Nissl (Cresil Violeta) e de Neo-Timm. De acordo com os resultados iniciais em animais sem implante (ver seção 4.4) foi escolhida a combinação da coloração de Neo-Timm (SLOVITER, 1982) com Nissl. A técnica de Neo-Timm é de grande utilidade na coloração de cortes de hipocampo, pois marca fibras contendo zinco pela reação com a prata. Uma vez que as fibras musgosas do giro denteado são ricas em zinco e que inervam exclusivamente CA3, esta coloração permite discernir com clareza os campos CA3, CA2 e CA1. Para maior detalhamento, as lâminas foram contra-coradas com cresil-violeta (coloração de Nissl), que marca os corpos celulares em violeta, dando maior destaque à camada piramidal (ver seção 4.4). Após a coloração as lâminas foram desidratadas e montadas com bálsamo do Canadá e cobertas com lamínulas de vidro. Após 48 horas de secagem, as lâminas foram limpas com xilol para remoção de excesso de bálsamo do Canadá e então fotografadas digitalmente.

3.8.3. Localização dos canais

Foi realizada uma foto de cada hemisfério de cada corte utilizando um microscópio Axioskop 40[®] (Carl Zeiss Inc.) com lente A-Plan[®] 2,5x/0,06 (Carl Zeiss Inc.) acoplado a uma câmera fotográfica (Canon PowerShot[®] A620), controlada remotamente pelo programa Axiovision 4.5[®] (Carl Zeiss Inc.), totalizando 144 fotos por animal. Para a correta localização dos fios e identificação dos canais que registraram cada subárea do hipocampo, foi necessária análise precisa das lâminas histológicas. Uma vez que os cortes são colocados manualmente nas lâminas, há grande diferença em suas orientações e posicionamentos. Para corrigir este desalinhamento entre uma foto e outra, as imagens digitais foram alinhadas usando programa desenvolvido em Matlab[®], utilizando-se dois pontos da linha média de cada foto como referência: um na junção entre os hemisférios cerebrais e outro onde a linha média encontra o corpo caloso. Após o alinhamento, a localização dos rastros de cada fio foi feita visualmente utilizando-se a sequência completa de fotografias digitalmente alinhadas, uma vez que os cortes não ficam perfeitamente paralelos à matriz, havendo diversos rastros de fios que aparecem em várias lâminas. Para auxiliar na identificação dos canais, devido a possíveis angulações ou fios que entortaram durante o implante, também foi inspecionado, juntamente com a histologia, o crânio contendo os fios após a retirada do encéfalo.

3.9. Estatística

As análises estatísticas foram todas realizadas utilizando-se apenas o último dia de registro de cada animal, com o programa SPSS[®] (v. 16.0).

Para inclusão dos disparos multiunitários na análise estatística foram adotados os critérios, por unidade, de no mínimo 50 disparos registrados e taxa de disparo média menor ou igual a 2,5 Hz. O número mínimo de disparos é necessário para que se tenha uma amostra razoável para a análise estatística. A frequência média é utilizada para distinguir possíveis células piramidais de interneurônios, que disparam a frequências maiores. Os dados foram analisados considerando-se unidades isoladas dos três ratos conjuntamente. Foi utilizada ANOVA de duas vias com medidas repetidas: área (CA1, CA2, CA3) como fator categórico e estágios do ciclo sono-vigília (VA, VQ, AL, Son, SOL e REM) como fator de medidas repetidas. Em casos de interação significativa,

avaliada pelo teste de Wilk's Lambda, foi então realizada uma ANOVA de uma via para cada estágio do ciclo, com correção de Bonferroni para comparações múltiplas, i.e., multiplicou-se o p valor de cada ANOVA por 6 mantendo-se o nível de significância em 5% (0,05). Após as ANOVAS de uma via que resultaram significativas foi realizado teste a posteriori de Bonferroni para comparar as três áreas em pares. Em casos em que a ANOVA de duas vias não resultou em interação significativa entre área e estágio, foram apenas avaliados os fatores área e estágio, com teste a posteriori de Bonferroni quando apropriado.

Os resultados da análise de coerência foram analisados separadamente por rato e por hemisfério (direito e esquerdo). Para que os resultados não fossem afetados por diferentes localizações de fios em cada região, procurou-se selecionar os melhores canais de cada região de maneira que a posição dos mesmos fosse semelhante entre os três ratos. Após a seleção de apenas um canal por região, foi utilizada ANOVA de duas vias com medidas repetidas: área (CA1-2, CA1-3, CA2-3) como fator categórico e estágio do ciclo sono vigília como fator de medidas repetidas (SOL e REM). Em casos de interação significativa, avaliada pelo teste de Wilk's Lambda, foi então realizada uma ANOVA de uma via para cada estágio do ciclo, com correção de Bonferroni para comparações múltiplas, i.e., multiplicou-se o p valor de cada ANOVA por 2 mantendo-se o nível de significância em 5% (0,05). Após as ANOVAS de uma via que resultaram significativas foi realizado teste a posteriori de Bonferroni para comparar as três áreas em pares. Em casos em que a ANOVA de duas vias não resultou em interação significativa entre área e estágio, foram apenas avaliados os fatores área e estágio, com teste a posteriori de Bonferroni quando apropriado.

Para cada par de regiões (CA1-2, CA1-3, CA2-3) em cada hemisfério foi realizada comparação estatística entre três bandas de frequência (Teta (6 a 12 Hz), Gama Lento (30 a 50 Hz) e Gama Rápido (90 a 110 Hz)) e dois estágios (SOL e sono REM) novamente com ANOVA de duas vias com medidas repetidas: estágio como fator categórico e banda como fator de medidas repetidas. Casos de interação significativa foram sucedidos de ANOVA com correção de Bonferroni (p valor multiplicado por dois) e teste a posteriori de Bonferroni para as três bandas. Em casos em que a ANOVA de duas vias não resultou em interação significativa entre área e estágio, foram apenas avaliados os fatores estágio e banda, com teste a posteriori de Bonferroni quando apropriado.

4. Resultados

“Cada etapa alcançada torna-se preparação para uma seguinte”

Biscoito da sorte chinês

4.1. Eletrodos

4.1.1. Matrizes importadas

Inicialmente foram utilizadas matrizes de eletrodos construídas na Duke University (Figura 5), para aprendizagem das técnicas cirúrgicas e de registro.



Figura 5 - Matrizes de eletrodos construídas na Duke University por Gary Lehew, utilizadas no início do trabalho, para treinamento cirúrgico e de registro. Os fios foram dispostos em arranjo 2 x 16 com espaçamento de 300 μm em ambas as direções. As matrizes foram colocadas sobre uma moeda brasileira de 5 centavos que serve como referência de tamanho na foto.

4.1.2. Construção de eletrodos

4.1.2.1. Perfuração dos moldes em papel

O primeiro passo na construção das matrizes é fazer o molde. Este é feito de folhas de papel, que são perfuradas nas posições e distâncias desejadas com auxílio de equipamento específico e de alta precisão (Figura 6 e seção 3.3).

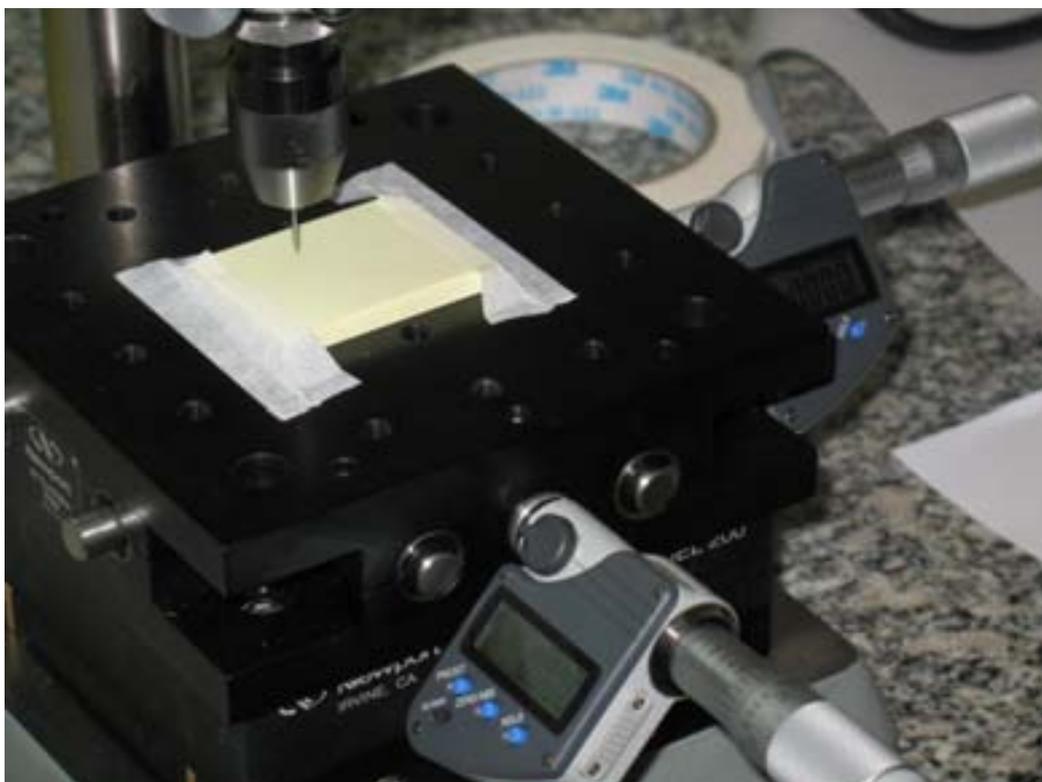


Figura 6 - Equipamento utilizado para realização de furos em folhas de papel, que servem de molde para construção das matrizes. O equipamento possui dois eixos com precisão micrométrica, permitindo movimentar a base que apóia as folhas de papel em dois sentidos. A cada posição desejada utiliza-se a broca para perfurar diversas folhas do bloco, criando então moldes idênticos.

4.1.2.2. Corte dos fios em bisel

Os fios foram cortados um a um em ângulo para realização do bisel (ver seção 3.3), o que facilita a penetração do tecido (Figura 7).



Figura 7 - Foto de fio antes de cortar em bisel (esquerda) e após o corte (direita). A formação da ponta facilita a penetração no encéfalo.

4.1.2.3. Montagem do feixe de fios

Cada fio é colocado em sua posição, passando nos furos equivalentes nas duas folhas paralelas do molde (Figura 8).

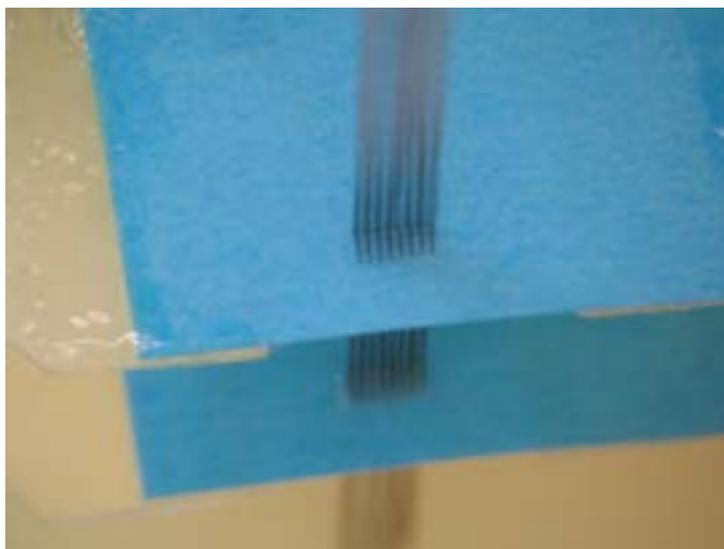


Figura 8 - Fios posicionados em um molde de arranjo 4 x 8 com espaçamento de 300 μm em ambas as direções.

O feixe é então ajustado na profundidade desejada e os fios colados entre si (Figura 9) (ver seção 3.3).

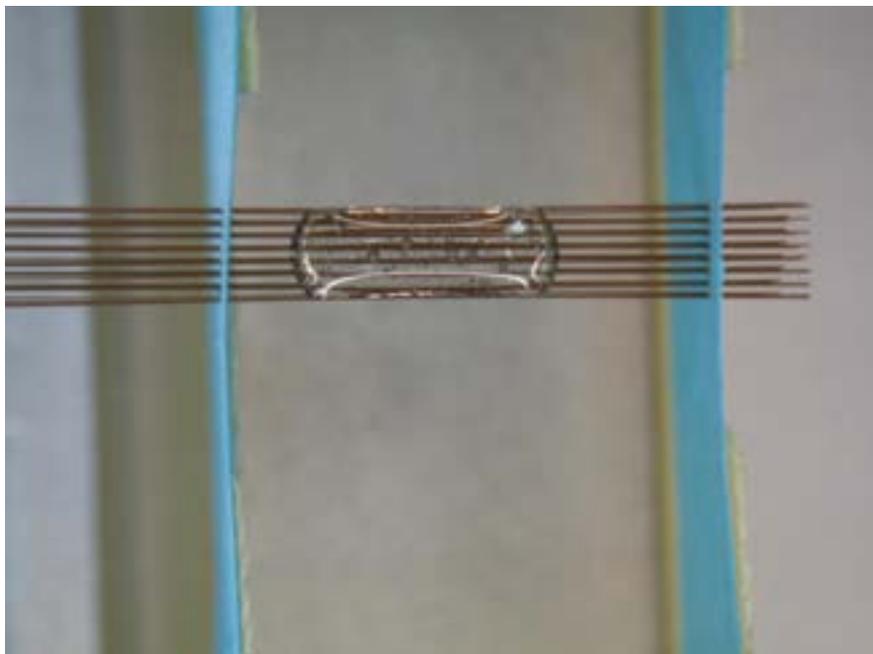


Figura 9 - Fixação dos fios em um feixe fixo, utilizando-se cola epóxi.

4.1.2.4. Montagem do conector e da placa

O micro-conector (Omnetics[®]) é encaixado na placa e os pinos soldados um a um (ver seção 3.3) (Figuras 10, 11 e 12).



Figura 10 - Placa de plástico perfurado com trilhas metálicas condutivas (esquerda) e micro conector Omnetics[®] já encaixado na placa (direita) para montagem de matrizes de eletrodos.

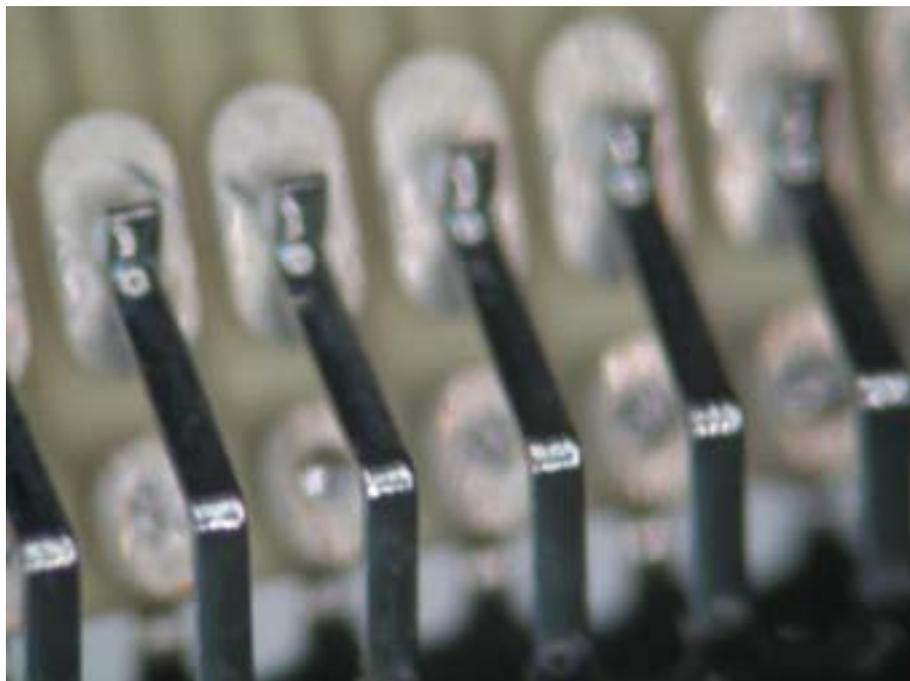


Figura 11 - Detalhe do encaixe entre o conector e a placa antes de soldá-los

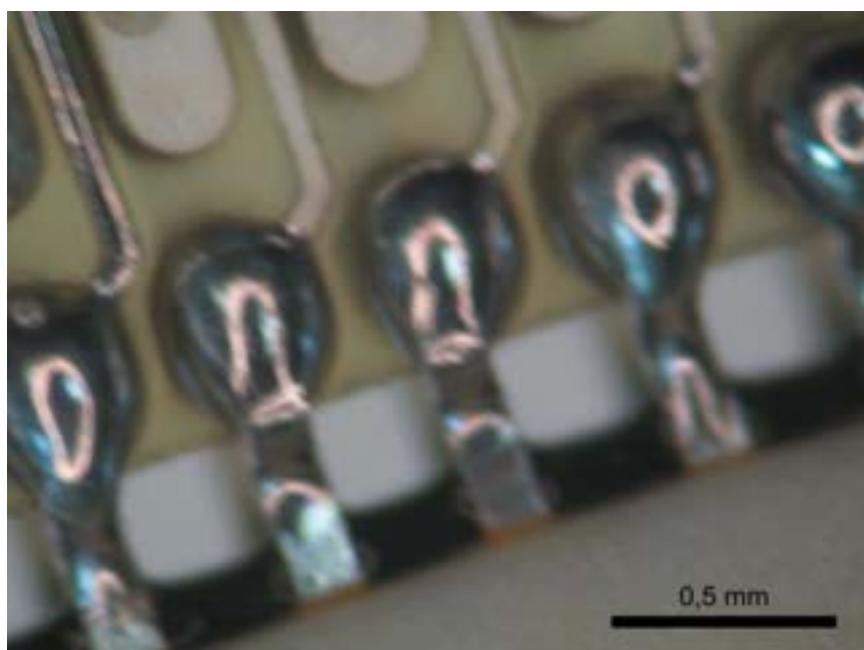


Figura 12 - Detalhe de soldas entre o conector e a placa.

4.1.2.5. Inserção e conexão dos fios na placa

O feixe de fios foi colado na placa, e cada fio passado em seu respectivo furo (Figura 13). Em seguida, todos os fios foram cortados (na extremidade oposta àquela a ser implantada), desencapados e conectados à placa com tinta condutiva.

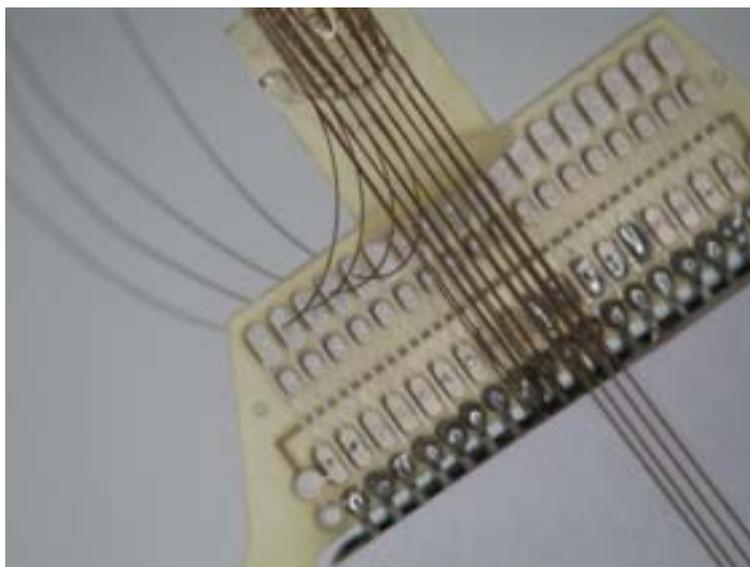


Figura 13 - Fios colados na placa, com os primeiros já passados em seus respectivos furos.

4.1.2.6. Modelos de Matrizes utilizados ao longo do trabalho

As primeiras matrizes foram construídas em arranjo 4 x 8 com espaçamento de 300 μm , ou seja, 4 fileiras e 8 colunas formando um retângulo. Posteriormente foram planejadas matrizes específicas para o hipocampo, com desenho mais complexo, posicionamento 4 x 5, espaçamentos variados e posições com pares de fios, de acordo com os esquemas das Figuras 14 e 15 e Tabela 1.

Tabela 1 – Modelos e quantidades de matrizes construídas ao longo do projeto.

Modelo	Arranjo	Distância entre fios (μm)	Comprimento (mm)	Fios em pares	Quantidade
1	4 x 8	300	5	Não	18
2	4 x 5	300	3, 4	Sim	2
3	4 x 5	300, 400, 500*	3, 4	Sim	7

* Ver Figuras 14 e 15 para maiores detalhes.

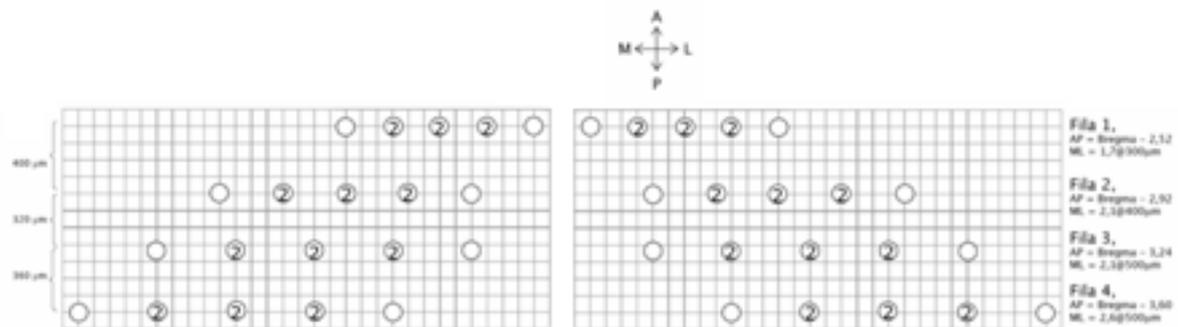


Figura 14 - Plano arquitetônico de matriz para o hipocampo, vista superior. Os fios são dispostos em 20 posições, organizadas em 4 fileiras no sentido AP e 5 colunas no sentido ML. As três colunas intermediárias de cada fileira são ocupadas por dois fios (marcadas com número 2 no esquema). As coordenadas representadas à direita referem-se ao fio mais medial de cada fila do hemisfério direito, sendo os demais posicionados de acordo com as distâncias representadas, tanto no eixo AP quanto no ML. A – Anterior. P – Posterior. M – Medial. L – Lateral. AP – Ântero-posterior. ML – Médio-lateral.

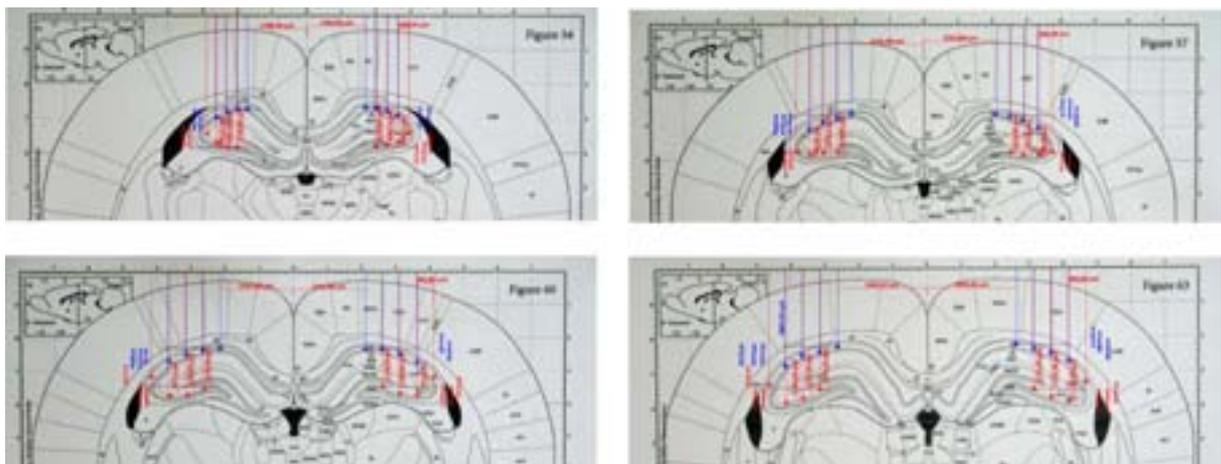


Figura 15 - Plano arquitetônico de matriz para o hipocampo, vista coronal. Esquema representado sobre imagens do atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2007). Em azul os fios destinados a CA1 e CA2, e em vermelho os destinados a CA3. Cada imagem representa uma das fileiras AP da matriz.

4.2. Animais

Durante a execução deste trabalho foram utilizados, a todo, 60 animais. O trabalho foi conduzido em diversas etapas, e muitos testes foram realizados, tanto cirúrgicos quanto histológicos e também comportamentais. A Tabela 2 mostra a quantidade de animais utilizada em cada etapa.

Tabela 2 – Quantidade de animais utilizados por etapa do trabalho. Com exceção dos 4 animais da etapa de registro do ciclo sono-vigília, todos os demais implantes foram realizados unilateralmente.

M1 com dura	HPC com dura	M1 sem dura	HPC sem dura	Histologia	Comportamento	Registro sono-vigília	Total
6	5	2	8	5	30	4	60

4.3. Cirurgia, perfusão e remoção do encéfalo

O resultado de cirurgias sem retirada da meninge é ilustrado a seguir e mostra encéfalo com aprofundamento no local do implante (Figura 16) (ver também seção 4.4.2).

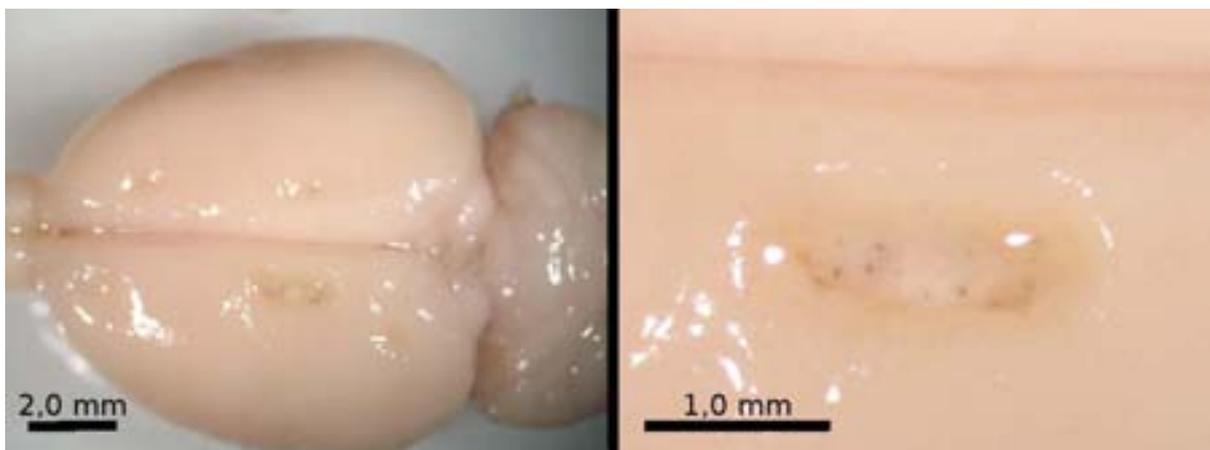


Figura 16 - Fotografias de encéfalo após implante com a dura-máter. Ocorreu pronunciado aprofundamento do tecido cortical, com apenas algumas marcas de fios que penetraram o tecido, visíveis mais claramente na ampliação à direita.

A adoção de matrizes com fios sobrepostos e com maior espaçamento (ver seção 4.1.2.6), realização cuidadosa de bisel e cirurgia com retirada da dura-máter solucionaram o problema do aprofundamento tecidual, como pode-se observar na Figura 17.

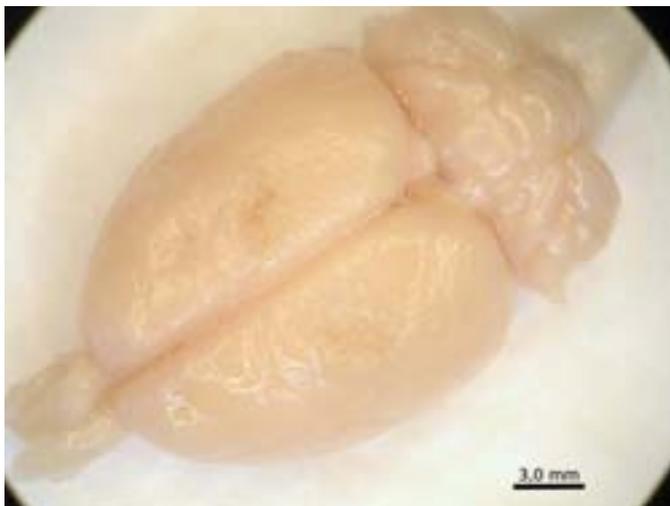


Figura 17 - Encéfalo com implantes bilaterais e minimização da pressão tecidual causada pelas matrizes. Este resultado foi obtido em cirurgia retirando a dura-máter, com matrizes com espaçamento maior que 300 µm e sobreposição entre os fios, que foram previamente afiados.

Após a retirada do encéfalo, a calota craniana foi inspecionada (Figura 18), bem como as matrizes, para observação do posicionamento dos fios (Figura 19).

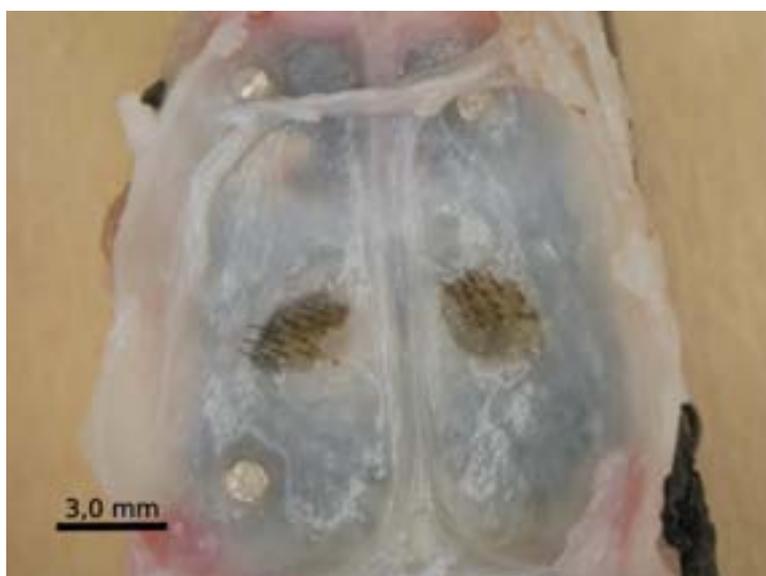


Figura 18 - Vista inferior da calota craniana após remoção do encéfalo. Pode-se observar as duas matrizes e eletrodos razoavelmente bem preservadas, mesmo após todo o processo de implante, sobrevida do animal, sacrifício e remoção do encéfalo. Visível também, em ambos os hemisférios, um pouco de tecido nervoso aderido à base do crânio. Esta perda foi muito difícil de evitar, pois esta parte fica aderida à dura-máter, ao crânio e aos fios, causando um dano visível também na histologia.



Figura 19 - Detalhe de duas matrizes após remoção do encéfalo, vistas lateralmente. Nota-se o paralelismo das quatro fileiras ainda bem preservado em ambas, bem como os diferentes comprimentos dos fios. Este resultado facilita a localização dos fios na histologia. Eventuais fios entortados também podem ser rastreados com maior clareza ao se observar conjuntamente a matriz na calota craniana e as fotografias histológicas alinhadas.

4.4. Histologia

4.4.1. Testes iniciais

Para visualização do hipocampo, inicialmente foram feitos testes com a técnica de Nissl (Cresil Violeta), Neo-Timm e combinações entre elas.

4.4.1.1. Nissl (Cresil Violeta)

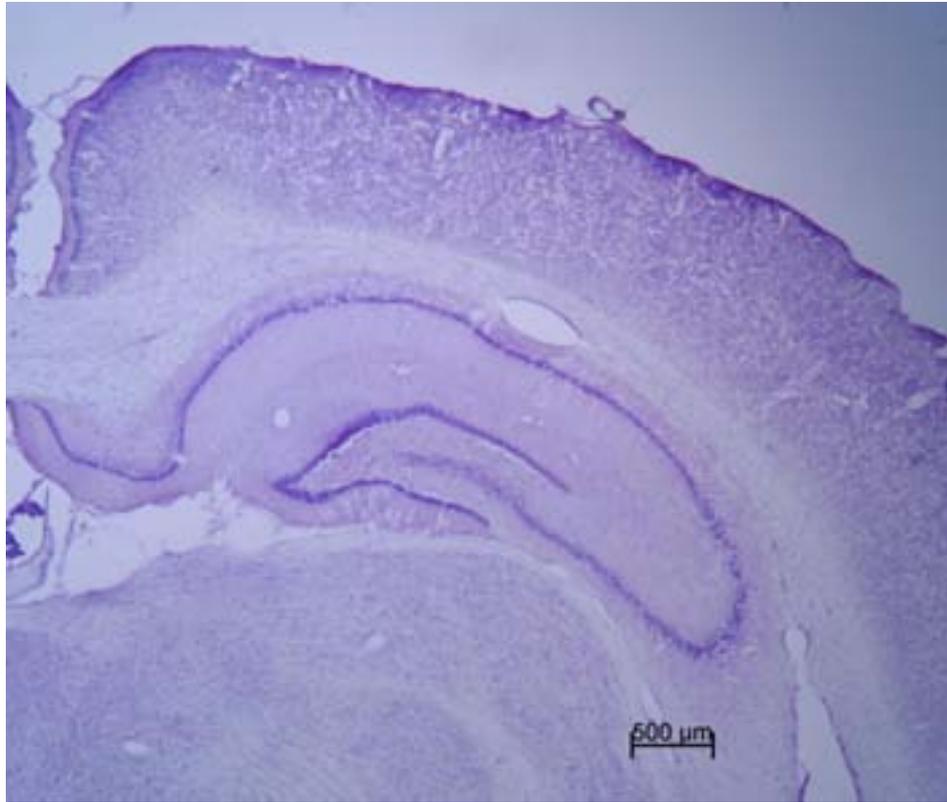


Figura 20 - Fotografia de corte coronal de hipocampo (aumento 2,5 x) corado com a técnica de Nissl (Cresil Violeta). Esta técnica é muito utilizada pelo fato de marcar bem os corpos celulares, pela sua simplicidade e baixo custo. Entretanto, como pode-se observar na fotografia, fica difícil determinar as bordas entre CA1, CA2 e CA3. Em especial, fica muito difícil definir onde é CA2.

4.4.1.2. Neo-Timm



Figura 21 - Fotografia de corte coronal de hipocampo (aumento 2,5 x) corado com a técnica de Neo-Timm. Esta técnica é útil em colorações do hipocampo pois marca em marrom/preto as fibras musgosas do GD. Esta marcação auxilia muito na definição do campo CA2, localizado exatamente onde estas fibras se afinam. Porém, a coloração não marca os corpos celulares, e a camada piramidal aparece como uma faixa estreita pouco corada.

4.4.1.3. Combinação de Neo-Timm com Cresil-Violeta

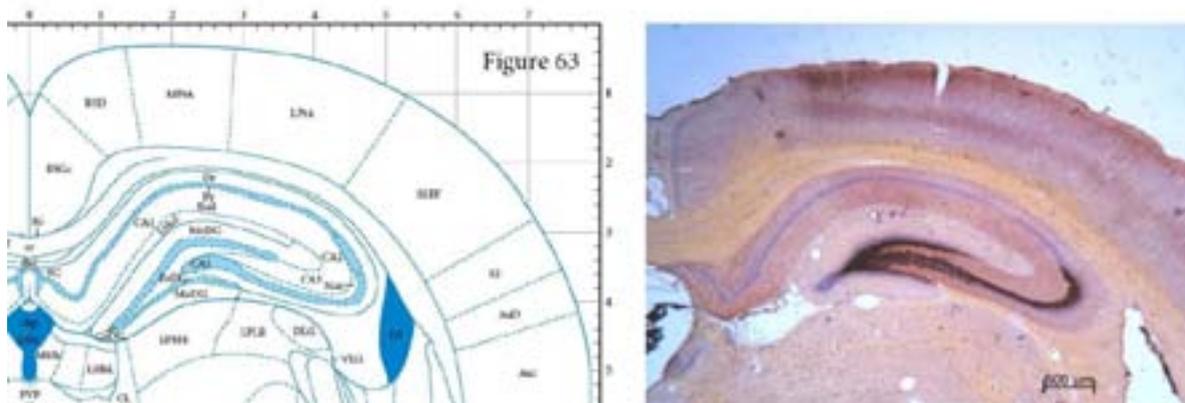


Figura 22 - Fotografia de corte coronal de hipocampo (aumento 2,5 x) corado com as técnicas de Neo-Timm e Cresil Violeta, a direita. Na esquerda esquema do Atlas de Paxinos e Watson (1997) para referência. A combinação de ambas as técnicas de coloração facilita identificar CA2, a área onde as fibras musgosas afinam e a camada piramidal é mais espessa.

4.4.2. Aprofundamento tecidual



Figura 23 - Fotografias de cortes de hipocampo (aumento 2,5 x) com coloração de cresil violeta. O implante foi realizado no hemisfério direito (fotografia à esquerda), sem retirada da dura-máter. Ocorreu pronunciado aprofundamento tecidual, com achatamento de toda a estrutura neocortical e também do hipocampo, sem que sejam visíveis rastros de fios que tenham penetrado o tecido. A foto da direita é do hemisfério contralateral ao implante e serve como referência do resultado cirúrgico no hemisfério direito (foto à esquerda).

4.4.3. Alinhamento de fotografias

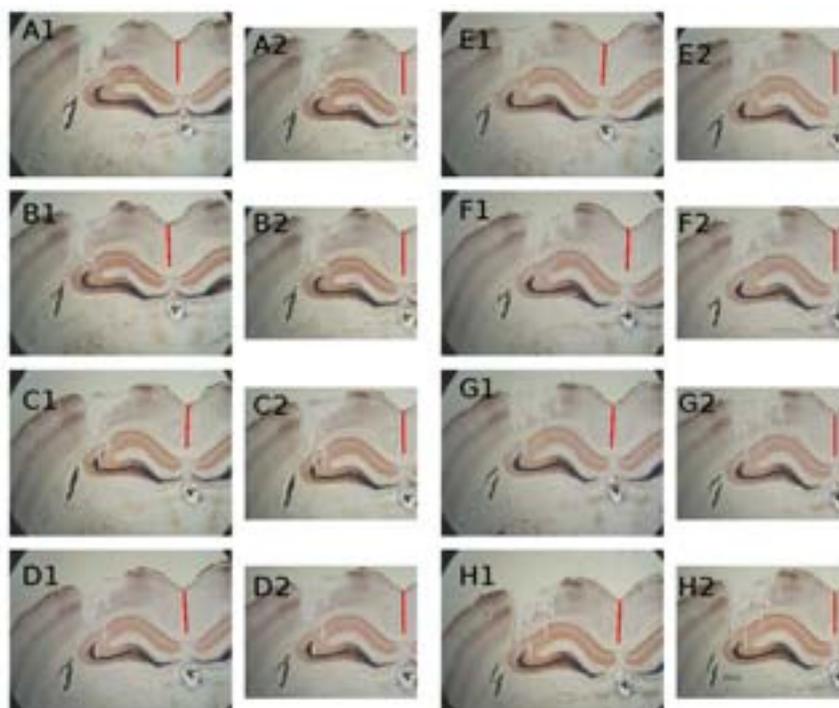


Figura 24 - Fotografias (aumento 2,5 x) seqüenciais de oito cortes do HPC direito. As imagens A-H de índice 1 são antes do alinhamento. Com índice 2 são as mesmas após alinhamento e corte da imagem, centrando no HPC. Todas na mesma escala (ver H2). As linhas vermelhas marcam a linha média do encéfalo, e servem de referência para os problemas de translação e rotação entre as fotos.

4.4.4. Localização de canais



Figura 25 - Fotografias de cortes de hipocampo (aumento 2,5 x) mostrando panorama de implante com retirada da dura-máter, utilização de matrizes customizadas e coloração combinada de Neo-Timm com Cresil-Violeta. Pode-se observar boa preservação da estrutura cortical, com alguma perda tecidual no neocórtex, devido principalmente ao procedimento de remoção do encéfalo, e não do implante per se.

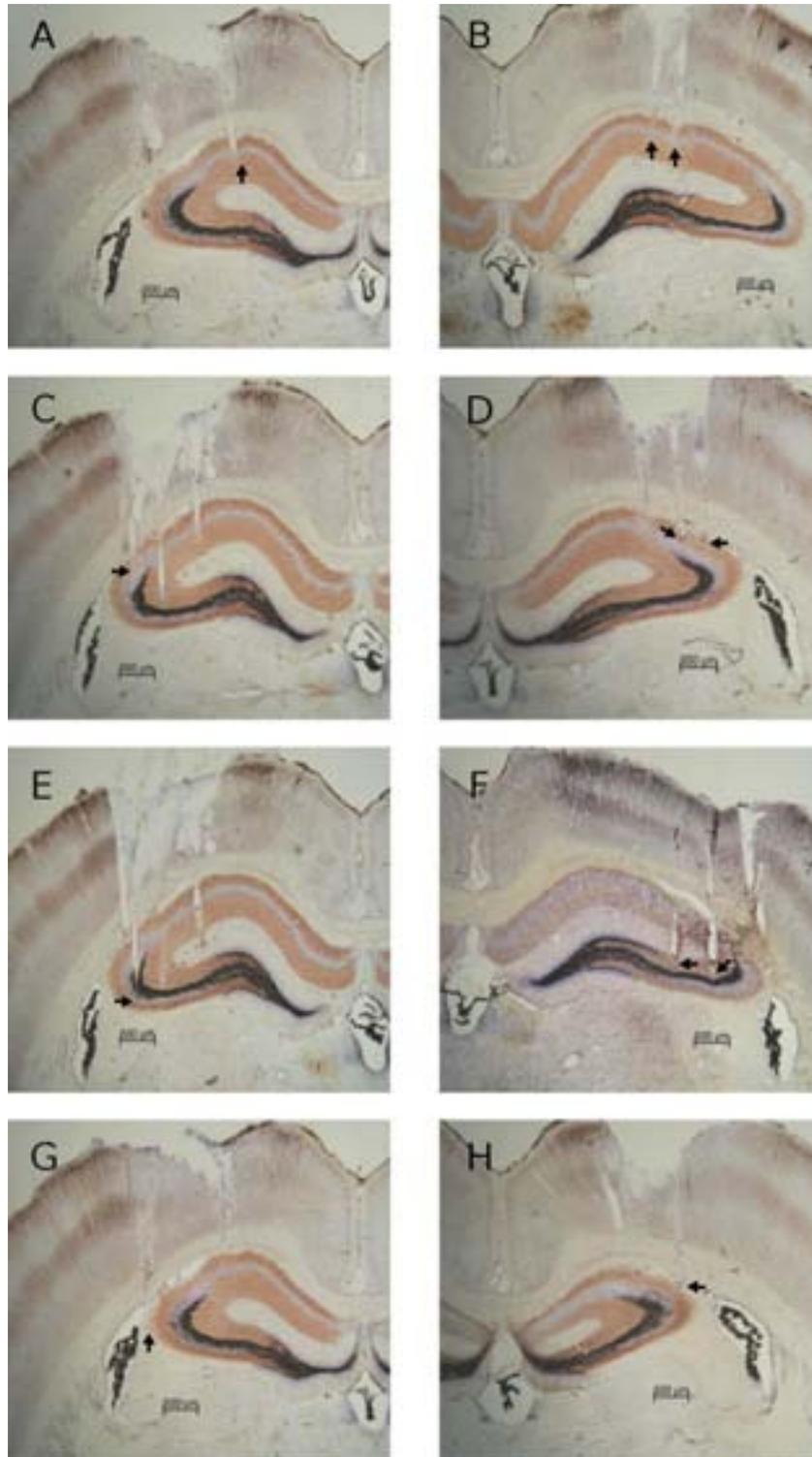


Figura 26 - Fotografias de cortes de hipocampo (aumento 2,5 x) ilustrando fios em CA1 (A, B), CA2 (C, D), CA3 (E, F) e fios que ficaram fora do hipocampo (G, H) em ambos os hemisférios. As setas indicam a posição das pontas dos fios, determinadas inspecionando-se todos os cortes e localizando a posição mais profunda encontrada para cada fio.

4.5. Análise de sinais

4.5.1. Potenciais de campo local

4.5.1.1. Inspeção visual

Identificamos a presença de ruídos e aparentes falhas em alguns dos 64 canais de cada animal (Apêndice A) possivelmente de causa técnica, que foram desconsiderados para qualquer análise posterior (ver exemplo em vermelho nas Figuras 27 e 28).

Outros canais apresentavam bastante ruído de movimento, especialmente em épocas em que o animal se movimentava bastante na caixa de registro, ruído este que aparecia simultaneamente em diversos canais (ver exemplos em preto nas Figuras 27 e 28).

4.5.1.2. Remoção de ruídos e artefatos

As figuras 29 e 30 mostram espectrogramas de um canal com pouco ruído e com muito ruído, respectivamente. O ruído da rede elétrica é bem identificável como uma linha horizontal de frequência fixa ao longo de todo o tempo de registro, enquanto o ruído de movimento é caracterizado por linhas verticais, espalhadas na frequência, porém restritas no tempo.

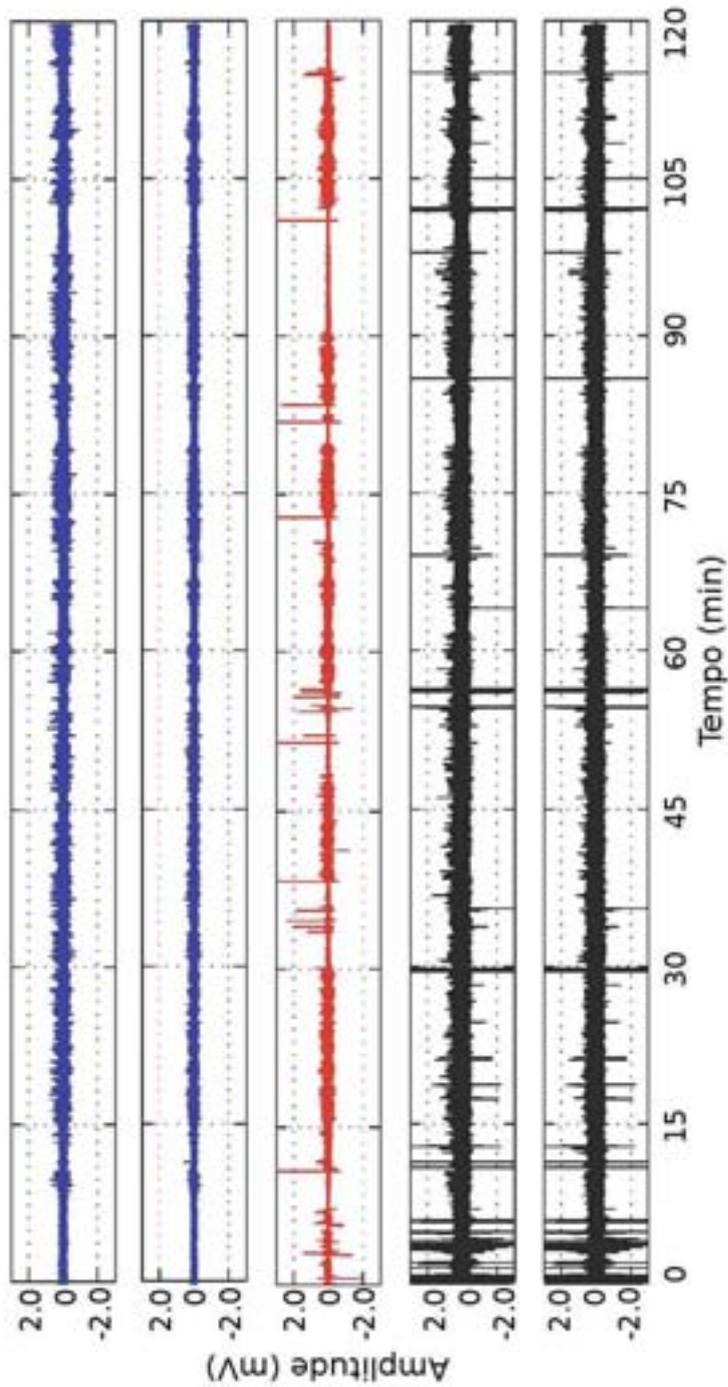


Figura 27 - Traçados de potenciais de campo local em duas horas de registro em cinco canais exemplo. Os dois superiores, em azul, representam registros sem ruído, os dois inferiores, em preto, canais com ruído de movimento, e o intermediário, em vermelho, um canal com problemas diversos, que foi excluído da análise posterior. Pode-se observar com clareza os momentos de SOL nos canais em azul pela variação da amplitude ao longo do tempo. O canal vermelho apresentava problemas intermitentes, ora contendo sinal parecido com os demais, ora perdendo o registro e ficando praticamente plano, tendo sido então excluído de qualquer análise posterior. Os canais em preto ilustram bem a simultaneidade do ruído de movimento entre os canais que o tem, bem como sua intensa amplitude (mais de 3,0 mV) quando comparado ao sinal fisiológico (menos de 0,5 mV).

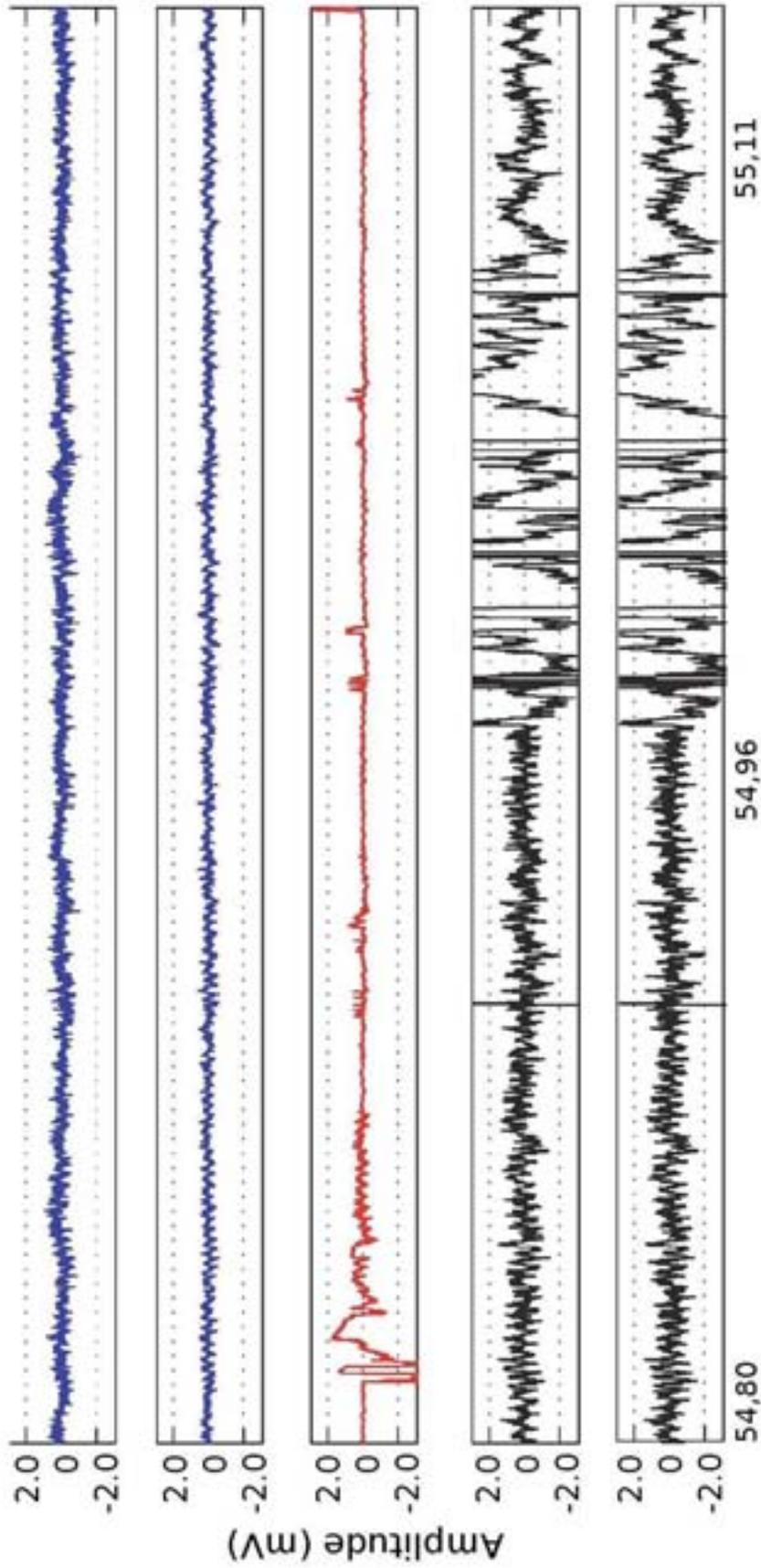


Figura 28 - Detalhe de traçados de potenciais de campo local (os mesmos da Figura 28) em alguns segundos de registro em cinco canais exemplo. Os dois superiores, em azul, representam registros sem ruído, os dois inferiores, em preto, canais com ruído de movimento, e o intermediário, em vermelho, um canal com problemas diversos, que foi excluído da análise posterior.

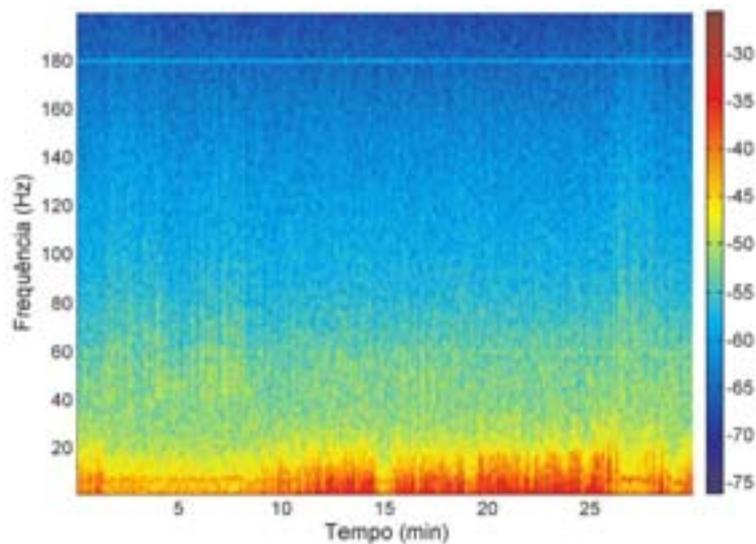


Figura 29 - Espectrograma de um canal com pouco ruído, tanto de movimento quanto de rede elétrica.

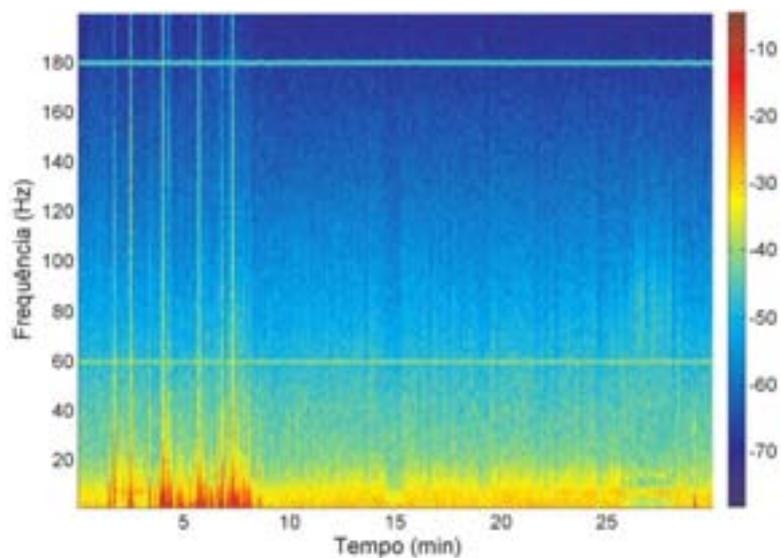


Figura 30 - Espectrograma de um canal com ruído, tanto de movimento quanto de rede elétrica.

Na figura 31 pode-se observar um traçado de registro e os respectivos componentes da ACI no mesmo período.

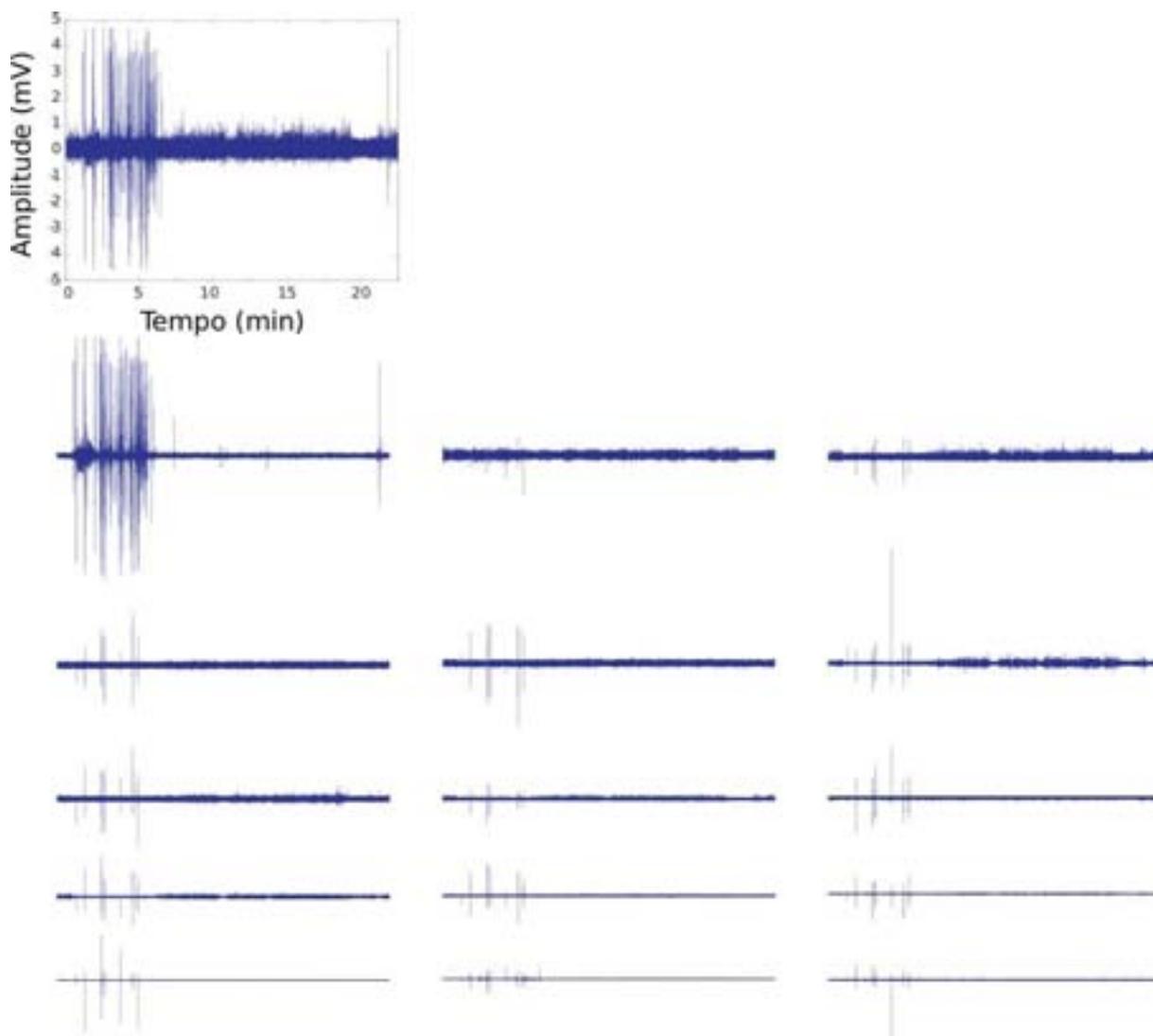


Figura 31 - Traçados de trecho de 25 minutos de um canal com ruído (esquerda superior, dentro da moldura com eixos) e dos 15 componentes da ACI resultante realizada em combinação com mais 14 canais. O componente 1 (esquerda superior) contém quase todo o ruído, preservando de maneira considerável o sinal nos demais momentos. Os componentes seguintes (da esquerda para a direita, três por linha) contém a maioria da informação fisiológica, com alguns remanescentes de ruído em todos os componentes.

Nas Figuras 32 e 33 pode-se observar os espectrogramas dos componentes da ACI, em uma mesma escala e em escalas individuais, respectivamente.

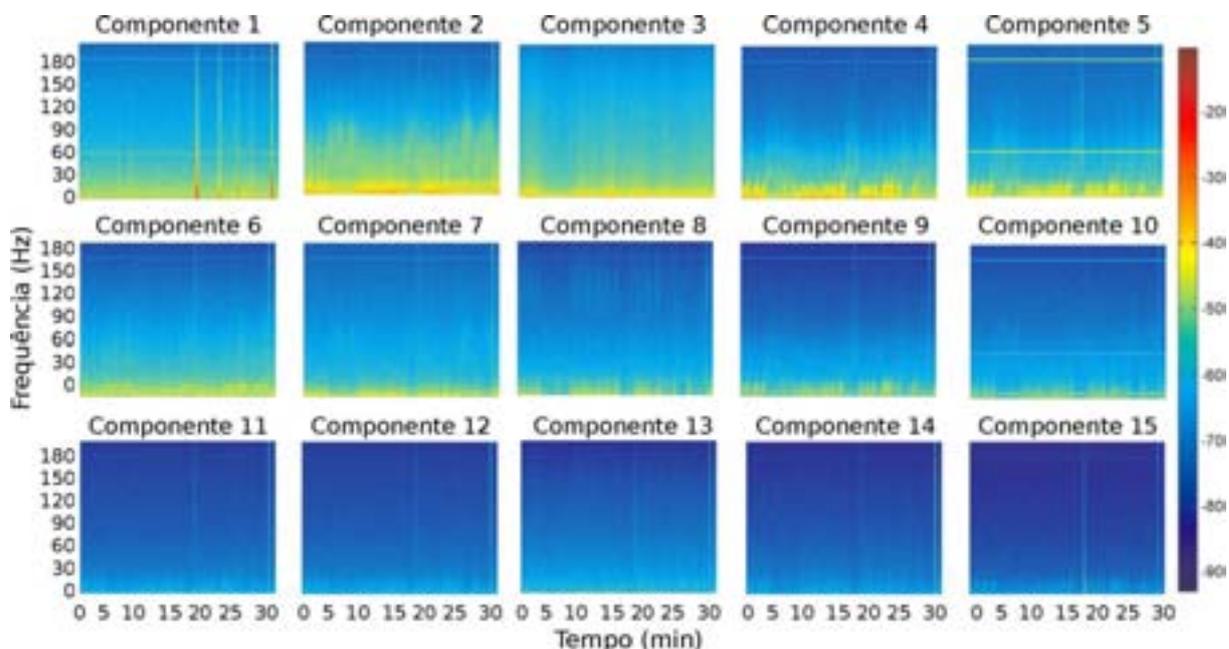


Figura 32 - Espectrogramas de 15 componentes da ACI na mesma escala de cor. Os componentes 1 a 5 possuem espectro de potência muito mais forte que os demais. A maior parte do ruído de movimento encontra-se no primeiro componente, observável como faixas verticais, de frequências variadas, porém específico no tempo. Faixa horizontais visíveis no componente 5, por exemplo, são típicas de ruído de linha de transmissão de energia, pois têm frequência bem restrita (60 Hz e harmônicos) e constância ao longo do tempo.

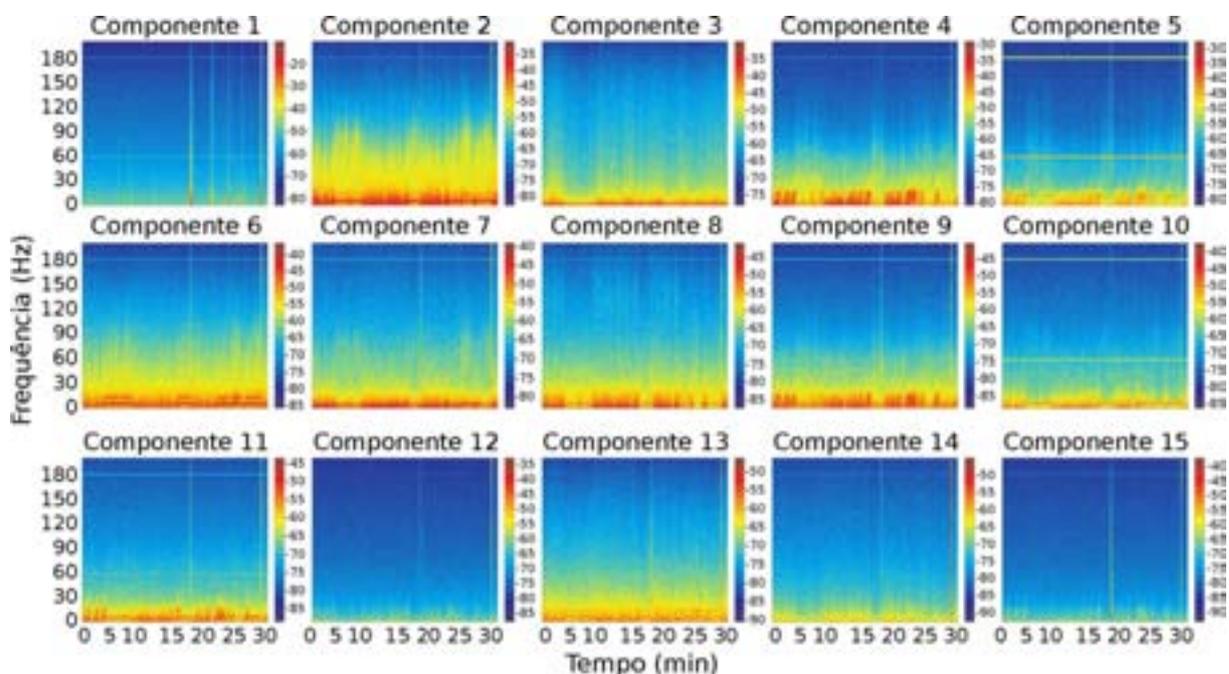


Figura 33 - Espectrogramas de 15 componentes da ACI em escalas de cor individuais, para melhor visualização de padrões intrínsecos de cada componente, em especial dos últimos (fileira inferior).

Na Figura 34 pode-se observar os traçados e espectrogramas de um canal e dois componentes que continham o ruído.

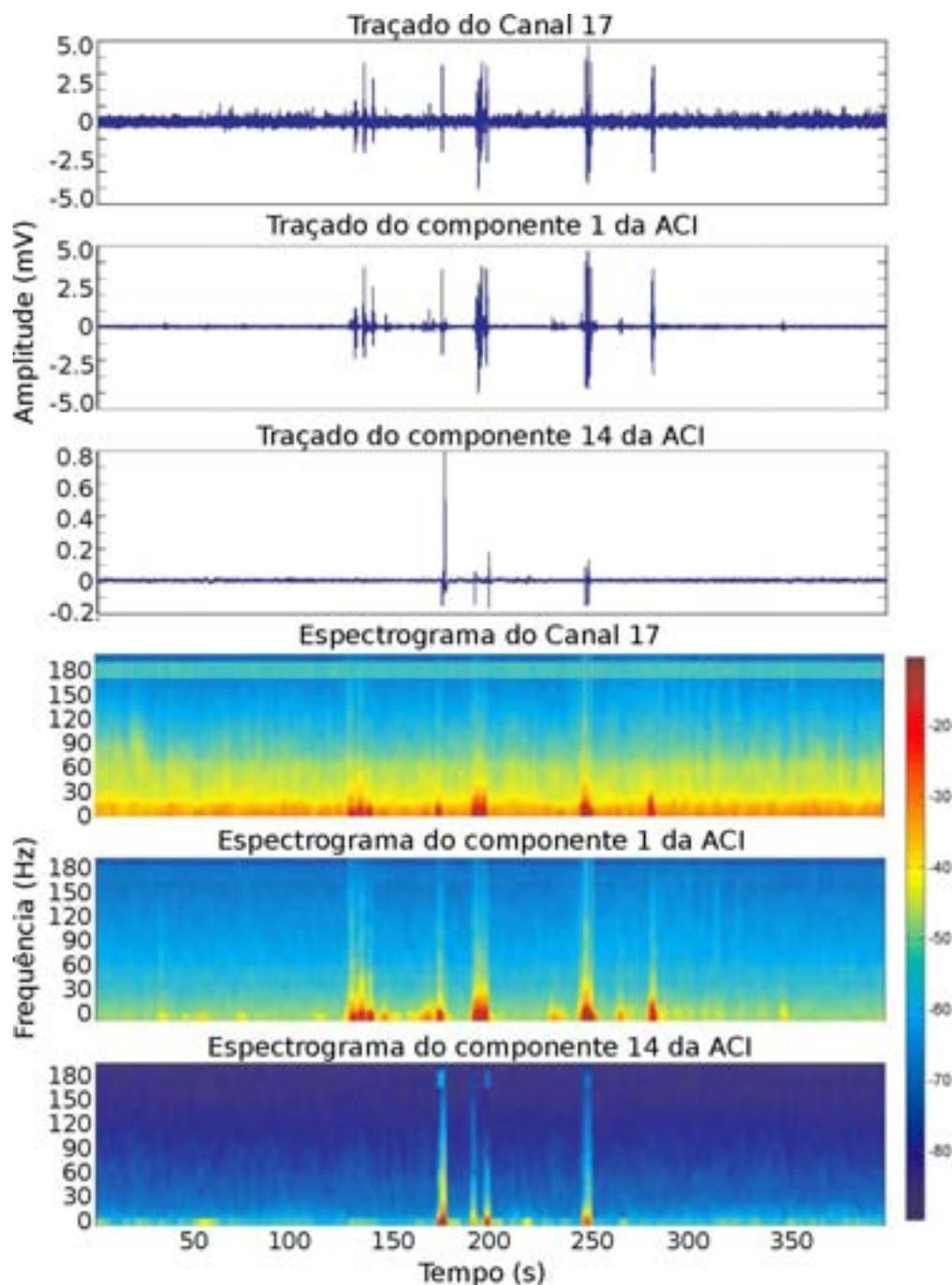


Figura 34 - Traçados e espectrogramas de um canal e dois componentes que continham ruído em um trecho de 400 s. Nesta figura fica clara a simultaneidade entre os ruídos nos traçados e as faixas verticais nos espectrogramas. Notar que a amplitude do componente 14 está em escala distinta, enquanto os três espectrogramas estão em mesma escala. O componente 1 novamente contém a maior parte do ruído, também visível no componente 14.

A Figura 35 mostra o traçado e o espectrograma de um trecho com ruído antes da ACI, e a Figura 36 após a remoção dos componentes com problemas.

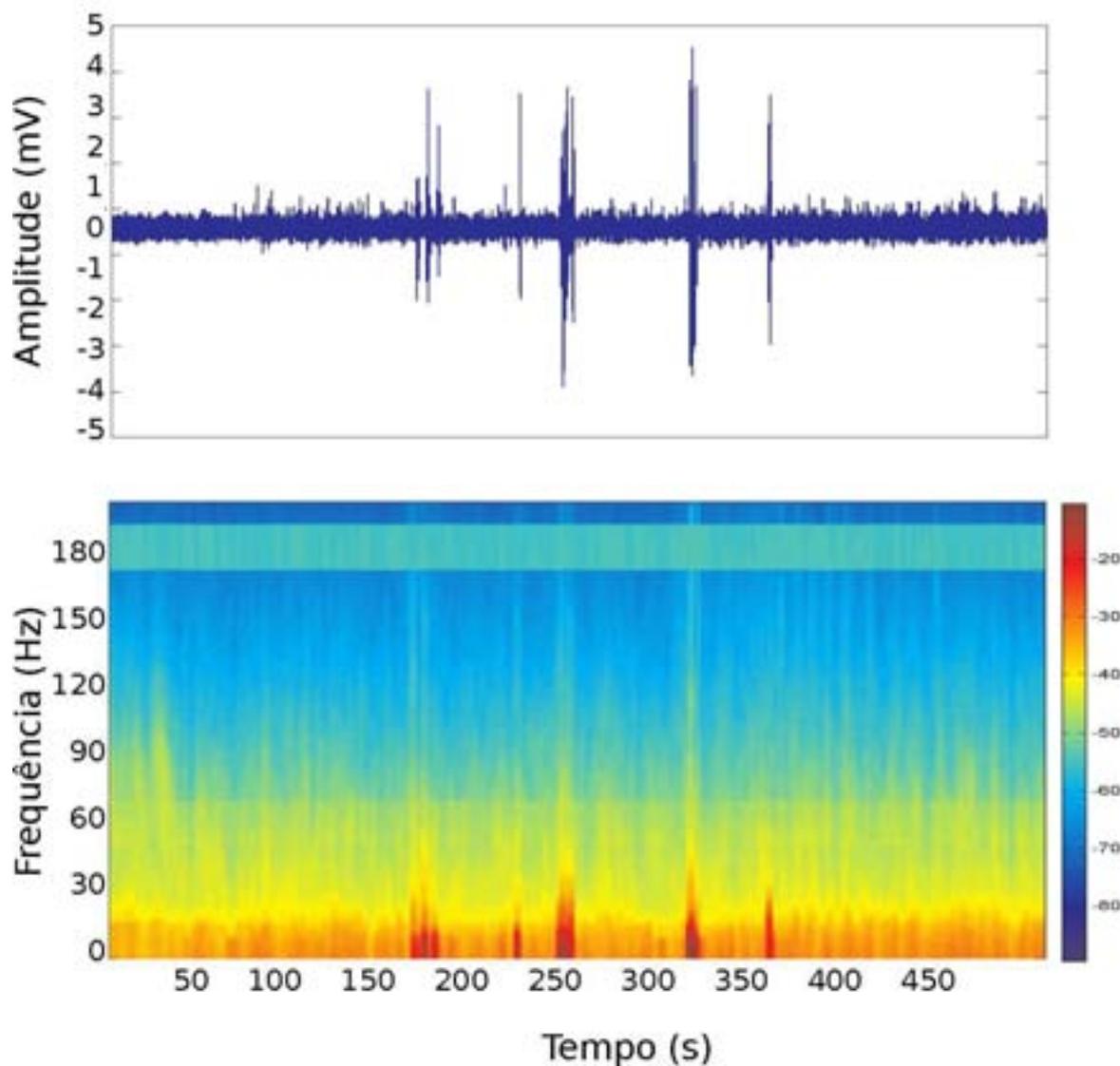


Figura 35 - Traçado e espectrograma de trecho de 500 s com ruído de movimento e de linha (60 e 180 Hz) antes da ACI.

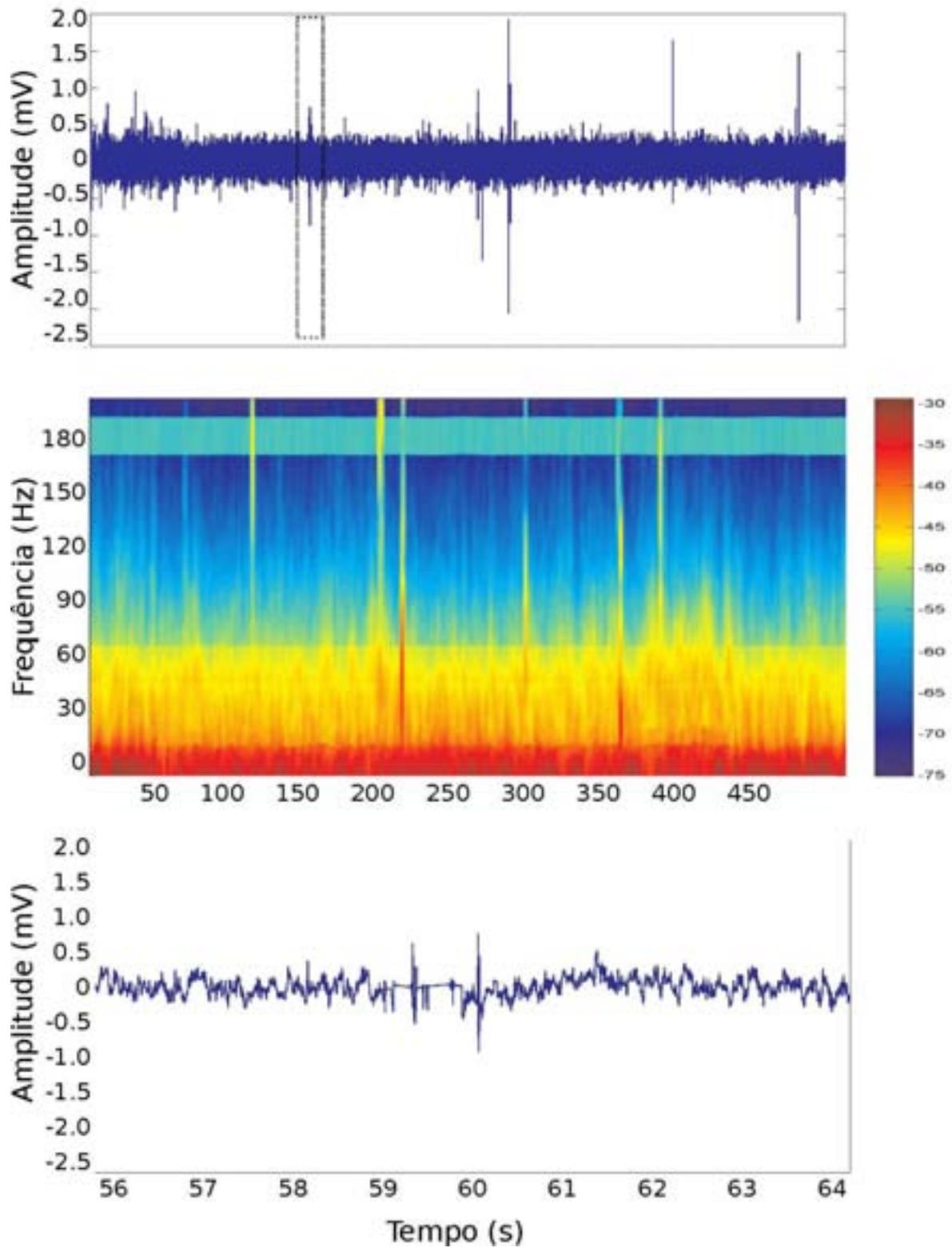


Figura 36 - Traçado e espectrograma de trecho de 500 s com ruído de movimento e de linha (60 e 180 Hz) após a ACI. O gráfico inferior representa a área em destaque do gráfico superior, em maiores detalhes na escala de tempo.

As Figuras 37 e 38 mostram o resultado de análise de correlação entre canais sem ruído e com ruído antes e depois da ACI, respectivamente.

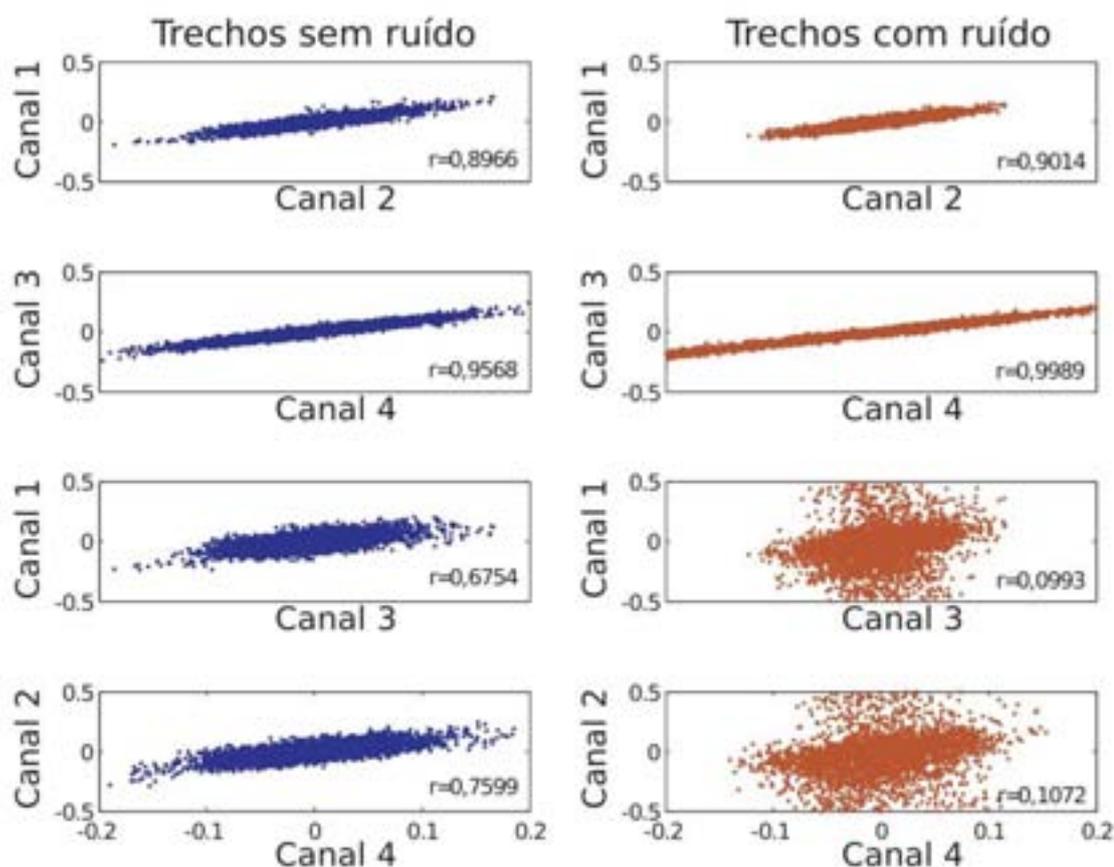


Figura 37 - Correlação entre quatro canais antes da ACI. Os canais 1 e 2 não continham ruído, os canais 3 e 4 sim. Em azul os resultados em trechos considerados sem ruído pela inspeção visual. Em vermelhos para trechos com ruído. Os correspondentes coeficientes de correlação estão dispostos em cada gráfico.

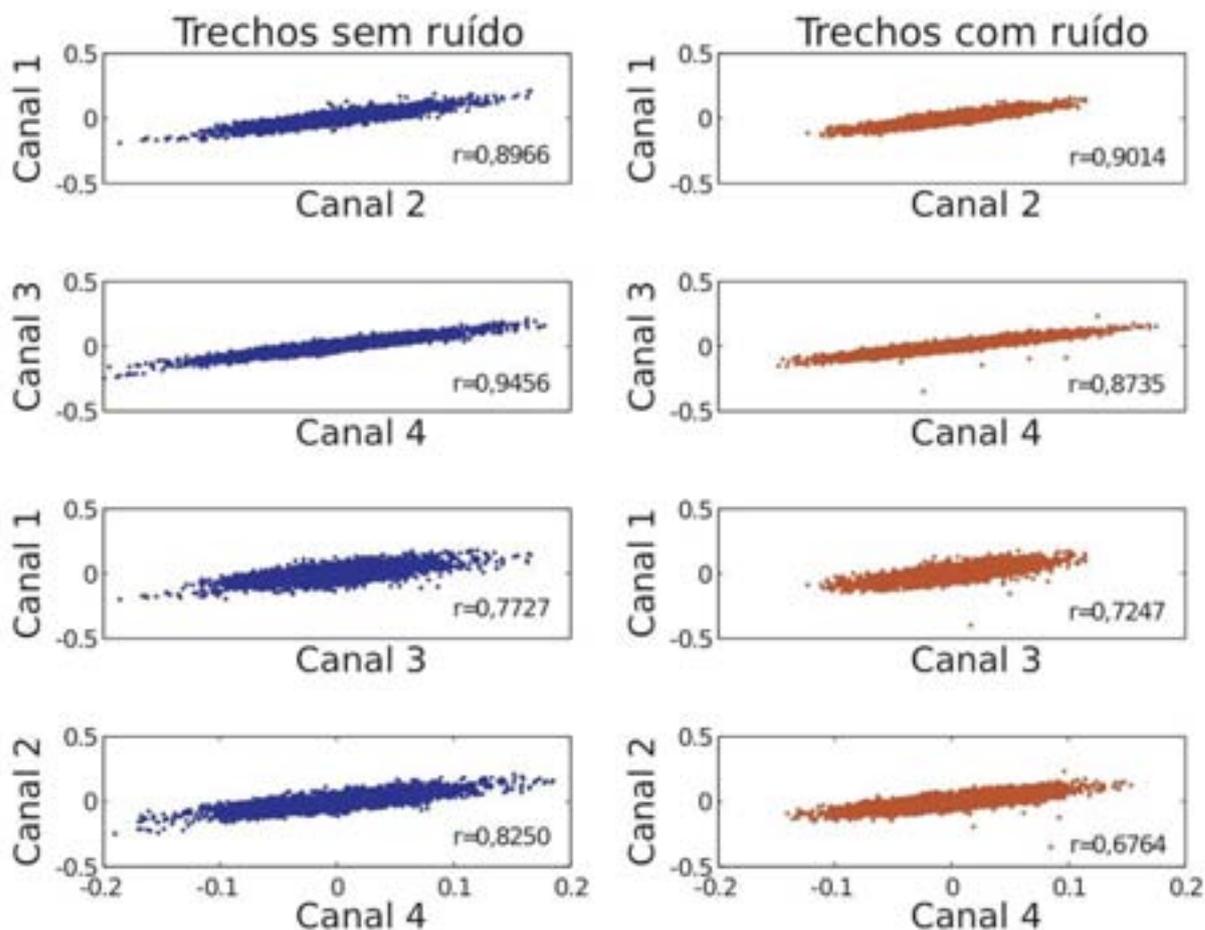


Figura 38 - Correlação entre quatro canais após a ACI. Os canais 1 e 2 não continham ruído, os canais 3 e 4 sim. Em azul os resultados em trechos considerados sem ruído pela inspeção visual. Em vermelhos para trechos com ruído. Os correspondentes coeficientes de correlação estão dispostos em cada gráfico.

4.5.2. Disparos Multiunitários

4.5.2.1. Classificação em unidades (Spike Sorting)

Tabela 3 – Quantidade de unidades isoladas dos registros de disparos em cada região, por animal. No animal ES57, CA2 no hemisfério esquerdo não foi atingido por nenhum eletrodo (representado por “-”).

Animal	CA1e	CA2e	CA3e	CA1d	CA2d	CA3d	Total
ES57	12	-	22	4	5	15	58
ES59	17	7	1	0	2	7	34
ES60	7	0	17	2	1	15	42
Total	36	7	40	6	8	37	134

Com os critérios adotados (ver seção 3.5.1) foram excluídas 11 unidades das análises posteriores, realizadas com o total de unidades de cada região, considerando-se os dois hemisférios de maneira conjunta, para os três animais, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Quantidade de unidades analisadas estatisticamente, considerando-se os dois hemisférios dos três ratos avaliados.

CA1	CA2	CA3	Total
39	10	74	123

4.6. Ciclo sono vigília

4.6.1. Classificação dos estágios

Fotografias do aparato experimental podem ser vistas na Figura 39.



Figura 39 - Fotografias do aparato comportamental utilizado durante as sessões de registro. O animal ficava em livre movimentação dentro de uma caixa inserida em uma gaiola de Faraday maior com isolamento acústico e eletro-magnético. A foto da esquerda mostra a gaiola aberta apenas para ilustração. À direita foto do sistema como foi utilizado durante todas as sessões de registro, fechado.

Exemplos de cada estágio comportamental e imagens dos respectivos registros de potenciais de campo local conforme utilizados para estagiamento do ciclo sono-vigília podem ser vistos nas Figuras 40 e 41. Um espectrograma com indicação dos respectivos estágios pode ser visto na Figura 42.

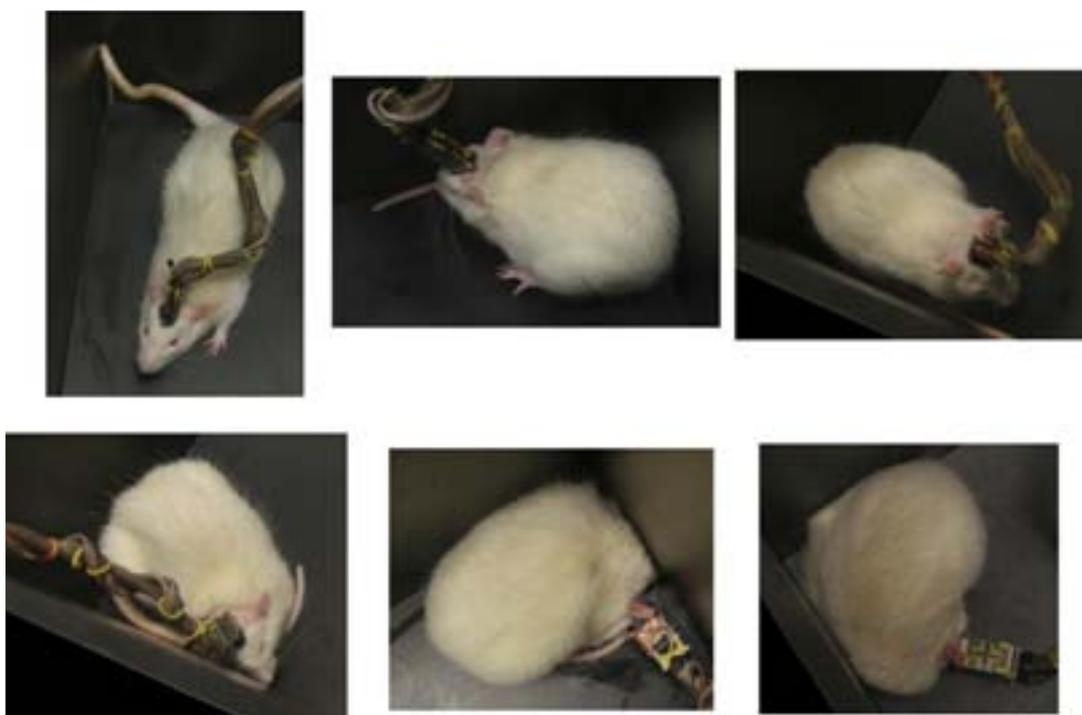


Figura 40 - Fotos representativas de cada estado comportamental. A partir da esquerda, fila superior: Vigília Ativa (VA), Vigília Quieta (VQ) e Auto Limpeza (AL). Fila inferior: Sonolento (Son), Sono de ondas lentas (SOL) e Sono REM (REM). A distinção entre SOL e REM não é clara observando-se apenas o estado comportamental, ainda mais por fotografias. Na observação do vídeo nota-se a atonia muscular no REM conforme o animal vai ficando mais relaxado, por vezes caindo para o lado. Para classificação precisa destes estágios, foi utilizada a combinação com a observação dos traçados (Figura 44) e também dos espectrogramas (Figura 45).

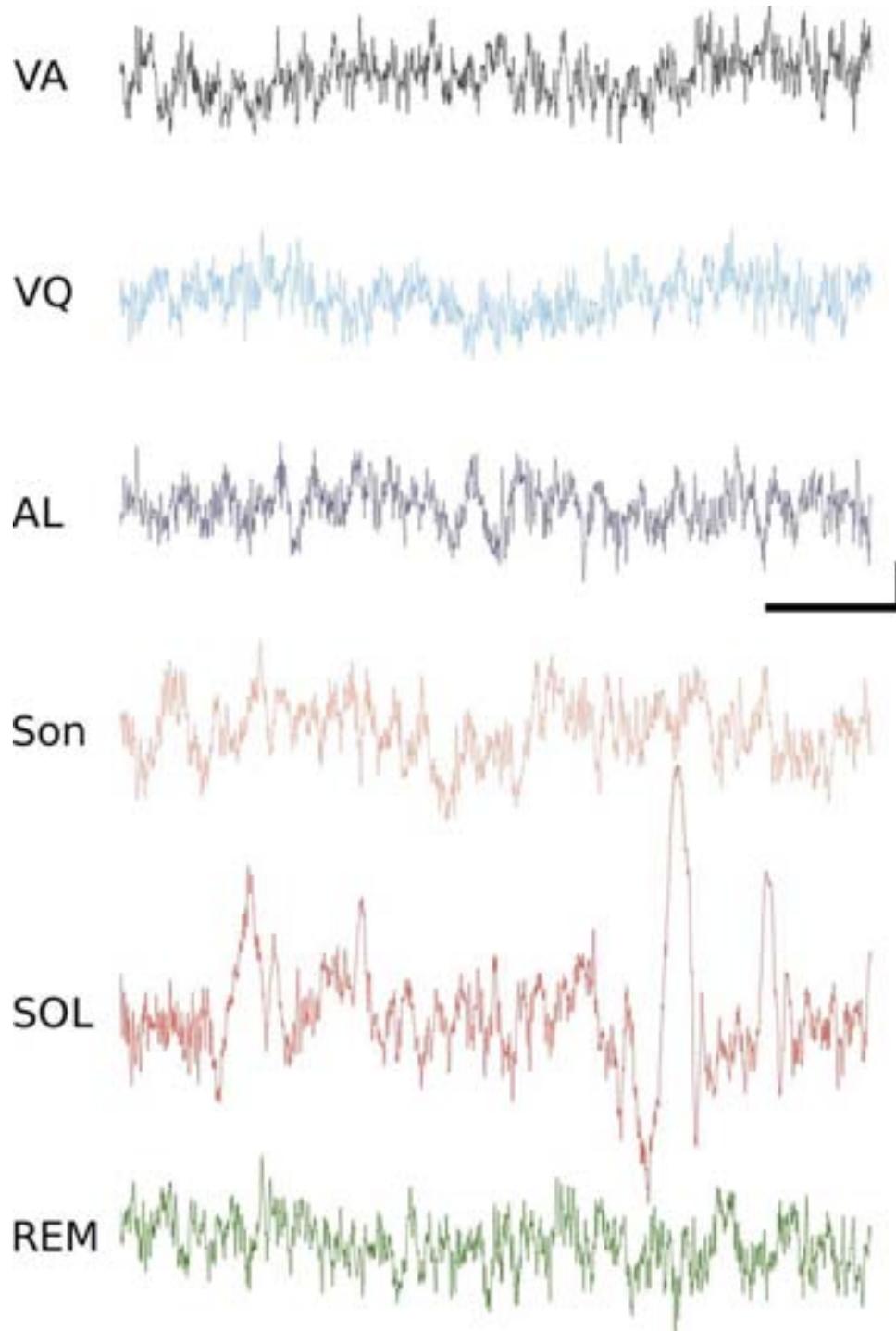


Figura 41 - Traçados típicos de potenciais de campo local a cada estágio do ciclo sono-vigília. Pode-se observar a presença clara do teta na VA (preto) e no sono REM (verde), bem como o aumento de amplitude e diminuição de frequência durante a sonolência (rosa) e ainda mais durante o SOL (vermelho). O estágio de autolimpeza (azul escuro) é muito semelhante aos de vigília, tanto quieta (azul claro) quanto ativa (preto). A distinção deste estado é, no entanto, facilmente identificável pelo vídeo comportamental (ver exemplo na fotografia da Figura 40) Escala: 0,5 s/0,1 mV.

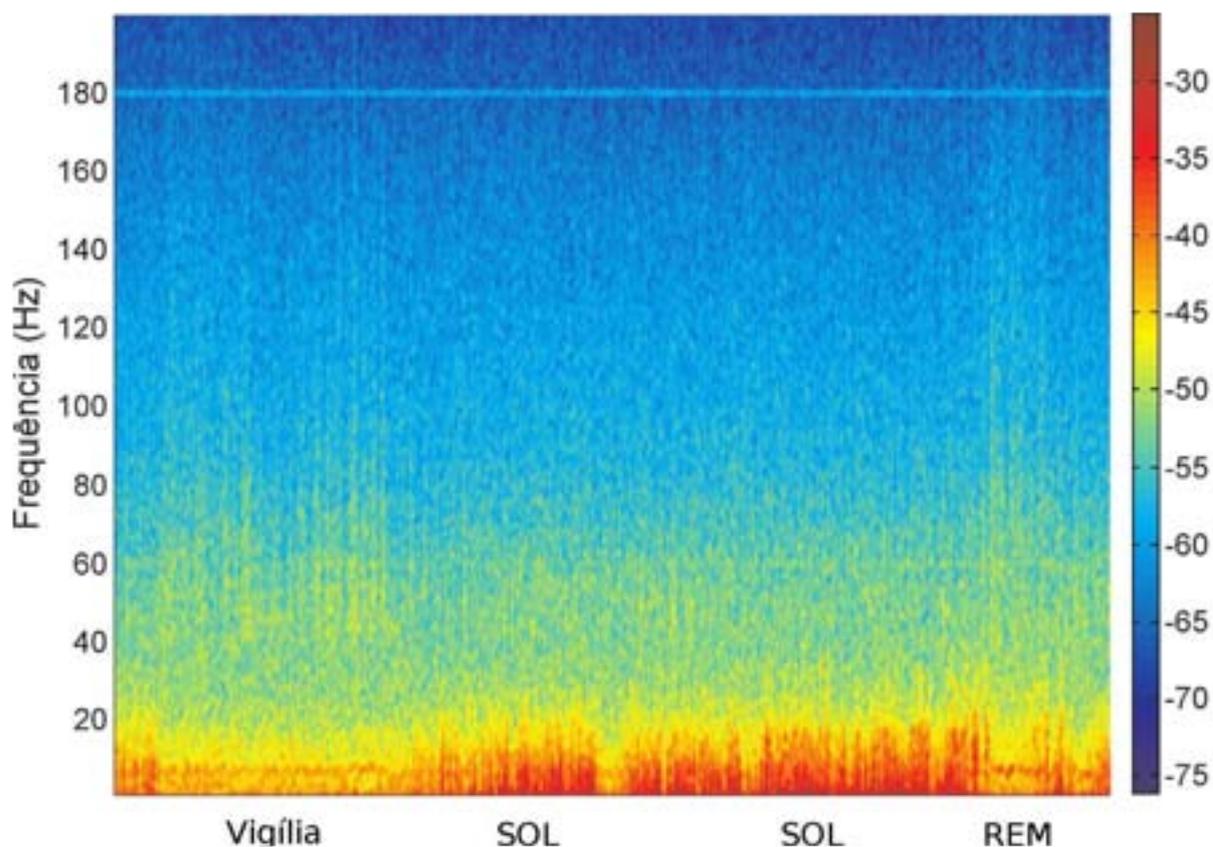


Figura 42 – Pelos padrões dos espectrogramas, quatro estágios podem ser identificáveis.

4.6.2. Duração dos estágios

A duração dos estágios foi razoavelmente constante ao longo dos dias para os três animais. A única exceção foi o animal ES57, que apresentou considerável aumento no tempo de vigília ativa no último dia. O SOL ocupou acima de 45% do período de registro em todos os animais e dias de registro, o que é esperado devido ao fatos de os registros terem sido realizados na fase clara do ciclo luminoso de 12/12 h, sendo durante esta fase que os ratos passam a maior parte do tempo dormindo. A duração do REM foi de cerca de 15% do tempo total, enquanto a vigília ocupou ao redor de 40%, somando-se a ativa, quieta e a autolimpeza. A duração de cada estágio, a cada dia de registro de cada um dos três animais está sumariada nas Tabelas do Apêndice B.

4.6.3. Descartes por ruído de artefato

O estado que mais perdeu tempo de registro foi o de vigília ativa. Estas perdas foram significativas, chegando a até cerca de 80% do período de vigília ativa (ES59, dia 5, Tabela 2 do Apêndice A), mas em geral ficou em torno de 10% para o animal ES57, 50% para o animal ES59 e 40% para o animal ES60. Também foram perdidos trechos consideráveis de registros em vigília quieta e autolimpeza. No entanto, durante os períodos de sonolência, SOL e sono REM foram perdidos poucos trechos, devido principalmente à ausência de movimentos nestes estados. Durante o SOL e o sono REM, observou-se que a grande maioria dos momentos em que houve ruído ocorreu nas transições entre estados, quando o animal se movimenta e faz ajuste de postura. Os valores exatos e porcentagens por dia e animal podem ser consultados nas Tabelas do Apêndice A.

4.6.4. Padrões de disparo ao longo do ciclo

4.6.4.1. Taxa de disparo

A análise estatística com ANOVA de duas vias (área x estágio, sendo estágios considerados como medidas repetidas) para a taxa de disparo indicou efeito significativo da interação entre área e estágio ($F_{10,232} = 4,465$; $p < 0,01$).

Foi então realizada ANOVA para cada estágio com correção de Bonferroni, cujos dados estão sumariados na Tabela 5. A análise resultou significativa para os estágios de AL e de sono REM, para os quais foi então utilizado teste a posteriori de Bonferroni entre as três áreas, revelando diferença significativa entre CA3 e CA1 (Tabela 6). Os resultados podem ser visualizados no Gráfico 2 e também na Tabela 1 do Apêndice D.

Tabela 5 - Resultados da análise de variância realizada para a taxa de disparo durante cada estágio do ciclo sono-vigília, entre as três áreas do corno de Ammon.

ANOVA	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
Taxa de disparo	$F_{(2,120)}=2,714$ $p=0,070$	$F_{(2,120)}=4,633$ $p=0,012^*$	$F_{(2,120)}=6,166$ $p=0,003^*$	$F_{(2,120)}=2,100$ $p=0,127$	$F_{(2,120)}=0,286$ $p=0,752$	$F_{(2,120)}=6,423$ $p=0,002^*$
p bonferroni	-	0,072	0,018*	-	-	0,012*

Tabela 6 - Resultados do teste a posteriori de Bonferroni para a taxa de disparo durante os estágios AL e REM.

Bonferroni	p valor AL	p valor REM
CA1 x CA2	1,000	1,000
CA1 x CA3	0,003*	0,002*
CA2 x CA3	0,348	0,422

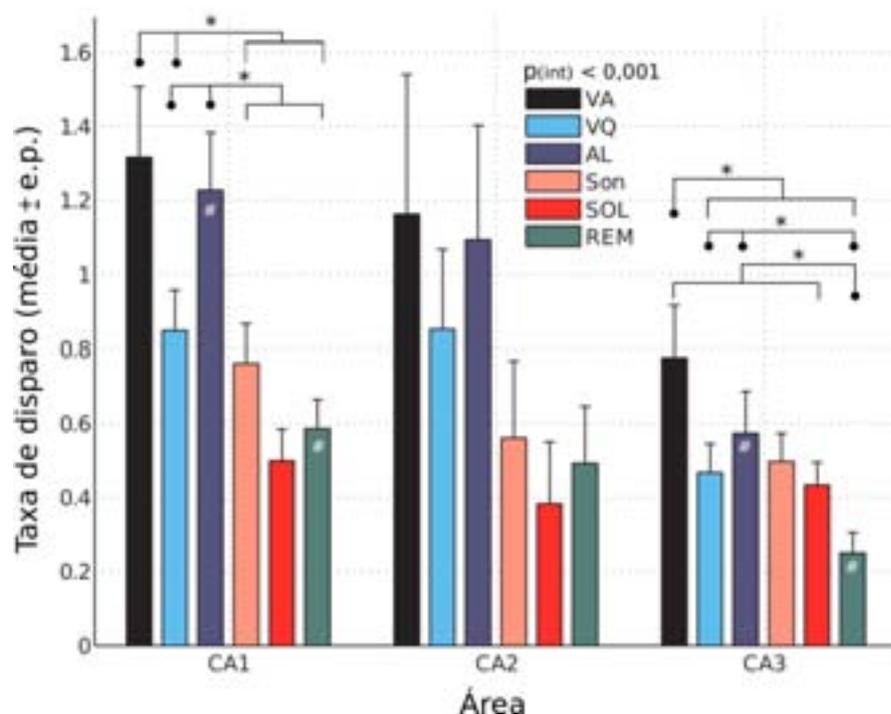


Gráfico 2 - Taxas de disparo por área e estágio do ciclo sono-vigília (média \pm e.p.). * indicam $p < 0,05$ entre estágios de uma mesma área. Chaves abertas indicam as diversas barras abaixo, chaves com pontas redondas indicam apenas uma única barra. # indica $p < 0,05$ entre áreas para um mesmo estágio. VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = Sono REM.

4.6.4.2. Intervalo entre disparos

A análise estatística com ANOVA de duas vias (área x estágio, sendo estágios considerados como medidas repetidas) para o intervalo entre disparos indicou e feito significativo da interação entre área e estágio ($F_{10,218} = 12,114$; $p < 0,01$). Foi então realizada ANOVA para cada estágio com correção de Bonferroni, cujos dados constam da Tabela 7. A análise resultou significativa para os estágios de SOL e REM, para os quais foi então utilizado teste a posteriori de Bonferroni entre as três áreas, revelando diferenças significativas entre CA1 e CA2, CA2 e CA3, mas não entre CA1 e

CA3 (Tabela 8). Os resultados podem ser visualizados no Gráfico 3 e também na Tabela 2 do Apêndice D.

Tabela 7 - Resultados da análise de variância realizada para o intervalo entre disparos durante cada estágio do ciclo sono vigília, entre as três áreas do corno de Ammon.

Intervalo entre disparos	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
ANOVA	$F_{(2,118)}=2,58$ 1 $p=0,080$	$F_{(2,119)}=4,508$ $p=0,013^*$	$F_{(2,120)}=3,668$ $p=0,028^*$	$F_{(2,120)}=1,313$ $p=0,273$	$F_{(2,120)}=11,649$ $P<0,001^*$	$F_{(2,114)}=26,75$ $P<0,001^*$
p bonf.	-	0,078	0,168	-	<0,01*	<0,01*

Tabela 8 - Resultados do teste a posteriori de Bonferroni para o intervalo entre disparos durante os estágios SOL e REM.

Bonferroni	p valor SOL	p valor REM
CA1 x CA2	0,014*	<0,001*
CA1 x CA3	0,036*	0,322
CA2 x CA3	<0,001*	<0,001*

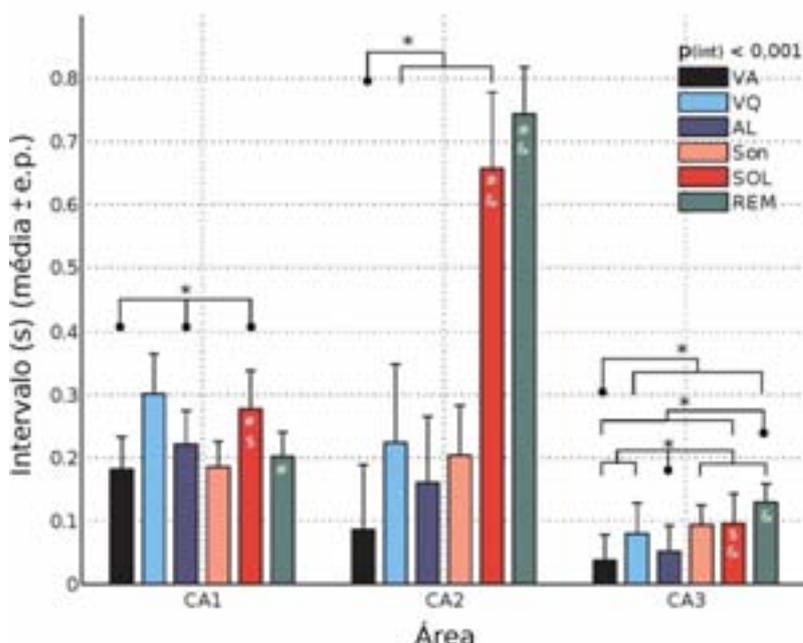


Gráfico 3 - Intervalos entre disparos por área e estágio do ciclo sono vigília (média \pm e.p.). * indicam $p < 0,05$ entre estágios de uma mesma área. Chaves abertas indicam as diversas barras abaixo, chaves com pontas redondas indicam apenas uma única barra. #, \$ e & indicam $p < 0,05$ entre áreas para um mesmo estágio. VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = Sono REM.

4.6.4.3. Disparos em salvas

Houve variabilidade no número de unidades que dispararam por salvas em cada região, sendo as quantidades maiores durante a AL e o SOL (Tabela 9).

Tabela 9 – Quantidade de unidades de cada região que dispararam em salvas (número de unidades (%)), por estágio do ciclo sono-vigília.

Área	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
CA1	29 (72,5)	30 (75,0)	35 (87,5)	32 (80)	36 (90)	29 (72,5)
CA2	6 (60)	6 (60)	10 (100)	7 (70)	7 (70)	7 (70)
CA3	39 (78)	39 (78)	43 (86)	37 (74)	40 (80)	28 (56)

A análise estatística com ANOVA de duas vias (área x estágio, sendo estágios considerado como medidas repetidas) para a proporção de salvas e disparos simples indicou efeito significativo da interação entre área e estágio ($F_{10,234} = 2,934$; $p < 0,05$).

Foi então realizada ANOVA para cada estágio com correção de Bonferroni. A análise resultou significativa apenas para o estágio de SOL (Tabela 10), para o qual foi então utilizado teste a posteriori de Bonferroni entre as três áreas, revelando diferença significativa apenas entre CA3 e CA1 (Tabela 11). Os resultados podem ser visualizados no Gráfico 4 e também na Tabela 3 do Apêndice D.

Tabela 10 - Resultados da análise de variância realizada para a razão entre salvas e disparos simples durante cada estágio do ciclo sono vigília, entre as três áreas do corno de Ammon.

Salvas/Disparos simples	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
ANOVA	$F_{(2,120)}=1,61$ 1 $p=0,204$	$F_{(2,120)}=0,11$ 6 $p=0,891$	$F_{(2,120)}=1,80$ 0 $p=0,170$	$F_{(2,120)}=1,11$ 6 $p=0,331$	$F_{(2,120)}=8,17$ 5 $P<0,001^*$	$F_{(2,120)}=4,60$ 5 $p=0,012^*$
p bonferroni	-	-	-	-	$<0,01^*$	0,072

Tabela 11 - Resultados do teste a posteriori de Bonferroni para a razão entre salvas e disparos simples durante o estágio de SOL.

Bonferroni	p valor SOL
CA1 x CA2	1,000
CA1 x CA3	0,001*
CA2 x CA3	0,177

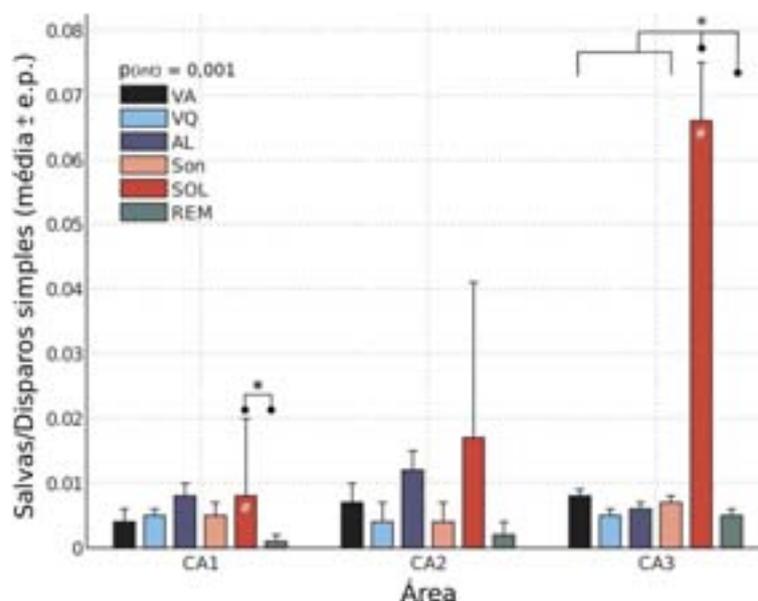


Gráfico 4 - Razão entre salvas e disparos simples por área e estágio do ciclo sono vigília (média \pm e.p.). * indicam $p < 0,05$ entre estágios de uma mesma área. Chaves abertas indicam as diversas barras abaixo com pontas redondas indicam apenas uma única barra. # indica $p < 0,05$ entre áreas para um mesmo estágio. VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = Sono REM.

A análise estatística com ANOVA de duas vias (área x estágio, sendo estágios considerado como medidas repetidas) para o número de disparos por salva não indicou efeito significativo da interação entre área e estágio ($F_{10,110} = 1,035$; $p = 0,420$). O efeito de área também não foi significativo ($F_{2,59} = 3,046$ $p = 0,055$). Entretanto, o efeito de estágio do ciclo sono-vigília foi significativo ($F_{3,914} = 3,646$, $p = 0,007$). Análise a posteriori com teste de Bonferroni revelou diferença significativa apenas entre os estágios de SOL e REM ($p = 0,001$, Tabela 12). Os resultados podem ser visualizados no Gráfico 5 e também na Tabela 4 do Apêndice D.

Tabela 12 – Resultados do teste a posteriori de Bonferroni (p valor) para a quantidade de disparos por salva a cada estágio do ciclo sono-vigília, considerando as três áreas conjuntamente.

Bonferroni	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
VA	-	1,000	1,000	0,826	0,513	1,000
VQ	1,000	-	1,000	0,948	0,603	1,000
AL	1,000	1,000	-	0,519	0,282	1,000
Son	0,826	0,948	0,519	-	1,000	0,121
SOL	0,513	0,603	0,282	1,000	-	0,001*
REM	1,000	1,000	1,000	0,121	0,001*	-

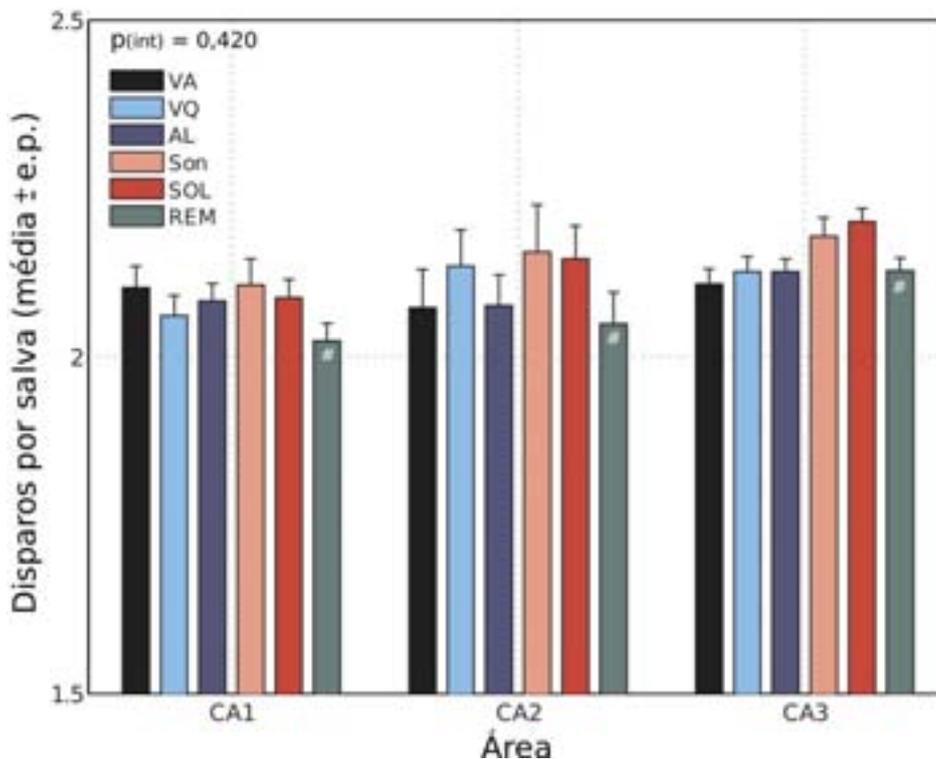


Gráfico 5 - Número de disparos por salva, para cada área e estágio do ciclo sono vigília (média \pm e.p.). * indicam $p < 0,05$ entre estágios de uma mesma área. # indica $p < 0,05$ entre áreas para um mesmo estágio. VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

4.6.5. Interações hipocampais ao longo do ciclo sono vigília

4.6.5.1. Perdas devido a ruído

As Tabelas do Apêndice C mostram, por animal, a quantidade de janelas de 10 s de duração para cada estágio após a remoção de ruídos. A perda foi muito grande durante os períodos de vigília, e os períodos de AL e Son, que já eram curtos, também ficaram com número muito pequeno de janelas, pois a duração dos episódios é, geralmente, inferior à 10 s. Por este motivo a análise de coerência foi realizada apenas para os estágios de sono REM e SOL.

4.6.5.2. Análise de coerência

A análise de coerência entre os diversos campos do cornu de Ammon em ambos os hemisférios confirma os dados da literatura de que o ritmo teta é predominante na função hipocampal. Este fato evidencia-se tanto pelo valor elevado existente no espectro de potência na

faixa do teta (6-12 Hz) quanto pelo pico existente na coerência nesta mesma faixa entre todos os campos analisados, tanto no sono REM quanto no SOL (Gráficos 6, 7 e 8).

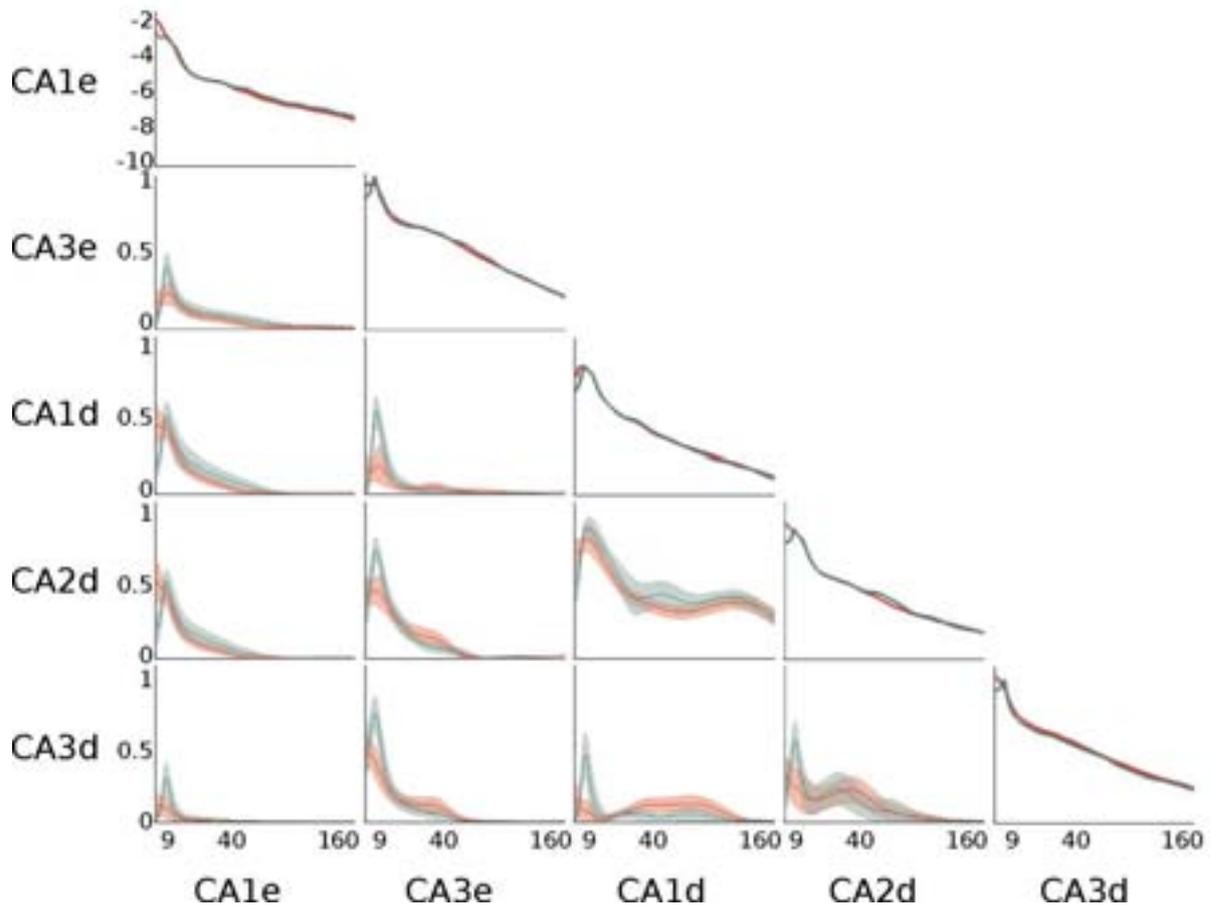


Gráfico 6 - Coerência entre os pares de regiões ipsi e contralaterais no SOL (vermelho) e no sono REM (verde) para o animal ES57, entre 0 e 160 Hz. Acima e a esquerda, coerências do hemisfério esquerdo. Abaixo e a direita, coerências do hemisfério direito. Abaixo a esquerda os pares contralaterais. Na diagonal os espectros de potência de cada região para os dois estágios analisados, em escala logarítmica.

O pico é geralmente maior e mais evidente durante o sono REM. Nas conexões contralaterais, o teta domina a coerência entre todas as estruturas, que é muito baixa nas demais frequências. Nas conexões ipsilaterais, além do pico evidente no teta, encontramos coerência elevada entre CA1 e CA2, nos três animais, em diversas faixas de frequência. Este efeito foi mais pronunciado no animal ES60, no qual a coerência entre CA1 e CA2 é bem elevada em todas as frequências analisadas (Gráficos 6, 7 e 8).

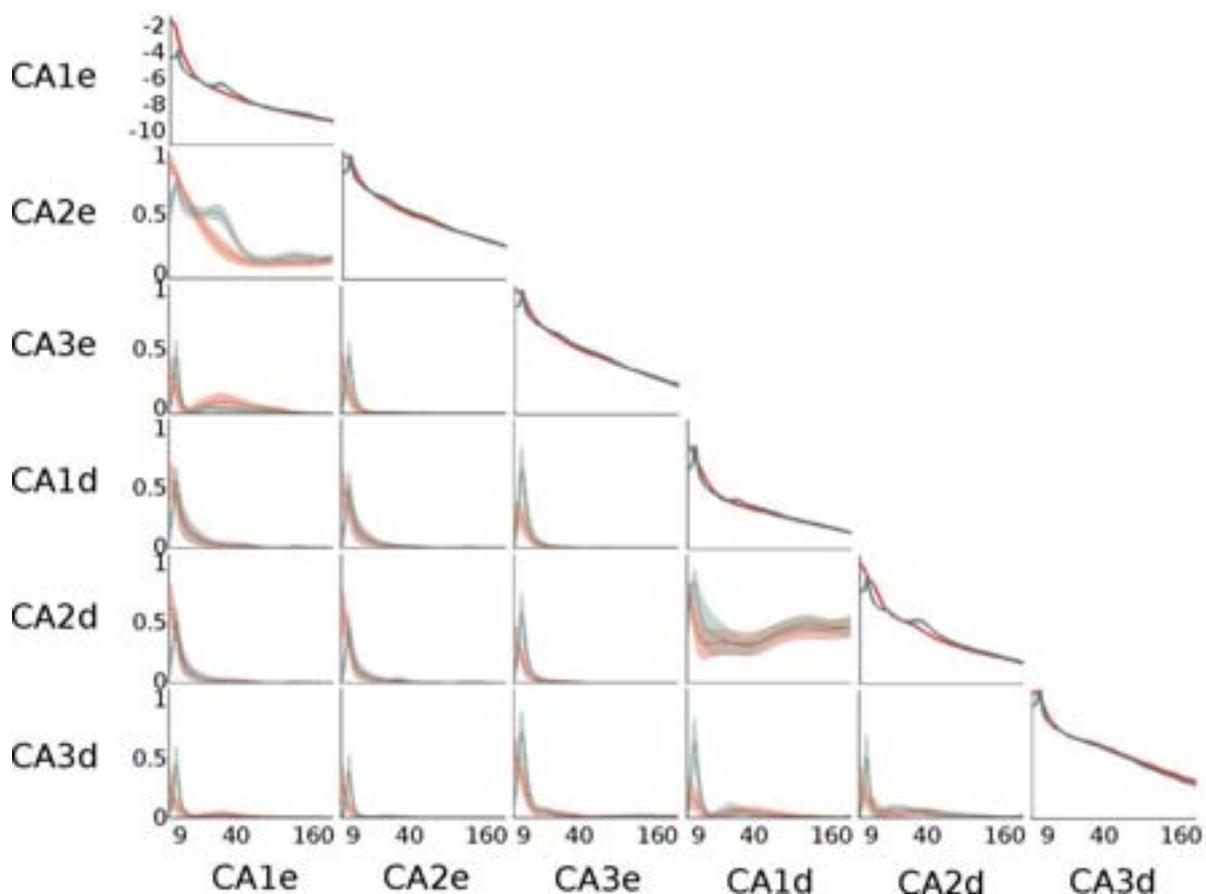


Gráfico 7 - Coerência entre os pares de regiões ipsi e contralaterais no SOL (vermelho) e no sono REM (verde) para o animal ES59, entre 0 e 160 Hz. Acima e a esquerda, coerências do hemisfério esquerdo. Abaixo e a direita, coerências do hemisfério direito. Abaixo a esquerda os pares contralaterais. Na diagonal os espectros de potência de cada região para os dois estágios analisados, em escala logarítmica.

Os resultados da análise estatística realizada em três faixas de frequência, teta (6 a 12 Hz), gama lento (30 a 50 Hz) e gama rápido (90 a 110 Hz), que foi realizada apenas entre as estruturas ipsilaterais, separadamente para cada animal, dado o pequeno número de animais registrados nas condições finais ($n = 3$) podem ser observados nos Gráficos 9 e 10 (ES57), 11 e 12 (ES59), 13 e 14 (ES60) e em detalhes nas Tabelas do Apêndice E.

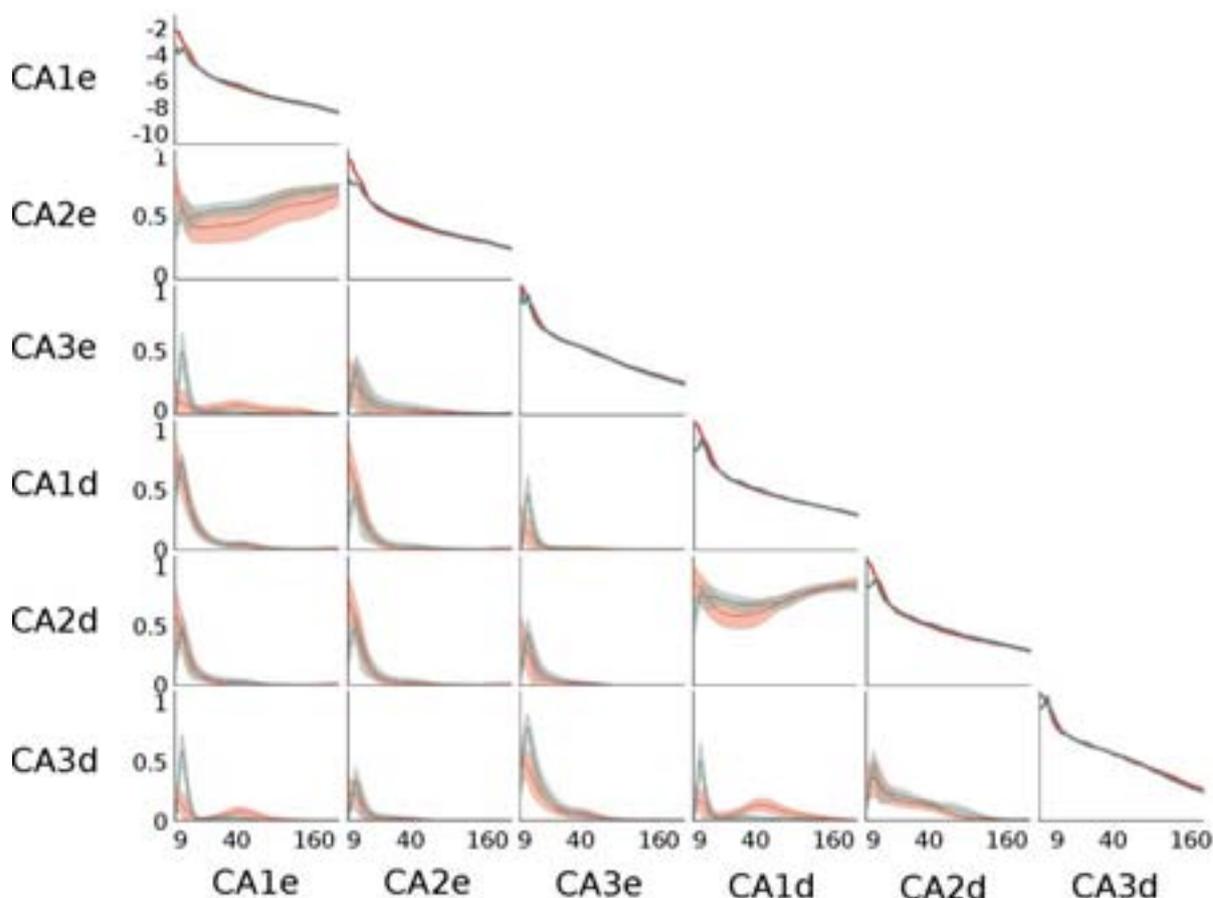


Gráfico 8 - Coerência entre os pares de regiões ipsi e contralaterais no SOL (vermelho) e no sono REM (verde) para o animal ES60, entre 0 e 160 Hz. Acima e a esquerda, coerências do hemisfério esquerdo. Abaixo e a direita, coerências do hemisfério direito. Abaixo a esquerda os pares contralaterais. Na diagonal os espectros de potência de cada região para os dois estágios analisados, em escala logarítmica.

Os resultados encontrados no Teta revelaram que a amplitude da coerência entre CA1-CA2 é significativamente maior que a coerência entre CA1-CA3 e entre CA2-CA3 nos dois estágios avaliados (SOL e REM). Apenas no hemisfério direito do animal ES59 no sono REM a comparação entre CA1-CA2 contra CA1-CA3 ficou no limiar da significância ($p=0,051$). A comparação entre CA1-CA3 e CA2-CA3 no teta mostrou alguns resultados discrepantes, não sendo significativa no hemisfério direito do animal ES60 (Gráfico 14) e no hemisfério esquerdo do animal ES59 durante o sono REM (Gráfico 12), mas sendo significativa em todos os demais casos.

No Gama Lento, quase todas as comparações foram estatisticamente significativas, sendo CA1-CA2 novamente maior que os demais em todos os animais. No animal ES57 não houve interação entre áreas e estágios nesta frequência, mas o efeito área foi significativo em todos os casos

(Gráficos 9 e 10). Apenas no hemisfério esquerdo do animal ES59 no SOL que a diferença entre CA1-CA3 e CA2-CA3 não foi significativa nesta banda (Gráfico 11).

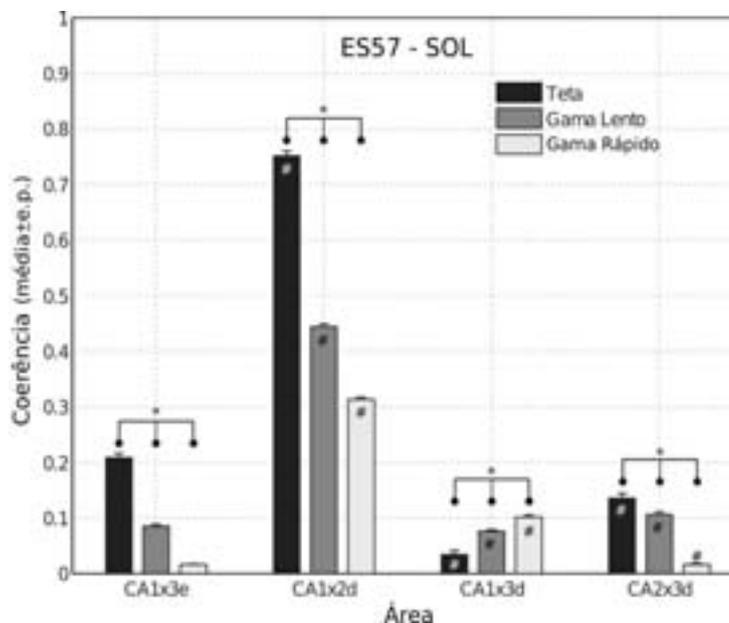


Gráfico 9 - Resultados estatísticos e comparações das estimativas de coerência para o animal ES57 em três bandas de frequência durante o SOL. As comparações foram realizadas somente entre registros de pares de regiões ipsilaterais. # diferença significativa entre áreas ipsilaterais para uma mesma banda. O asterisco (*) indica diferença significativa entre bandas para uma mesma área, ambos com teste a posteriori de Bonferroni com $p < 0,05$. Os valores exatos podem ser consultados no Apêndice E.

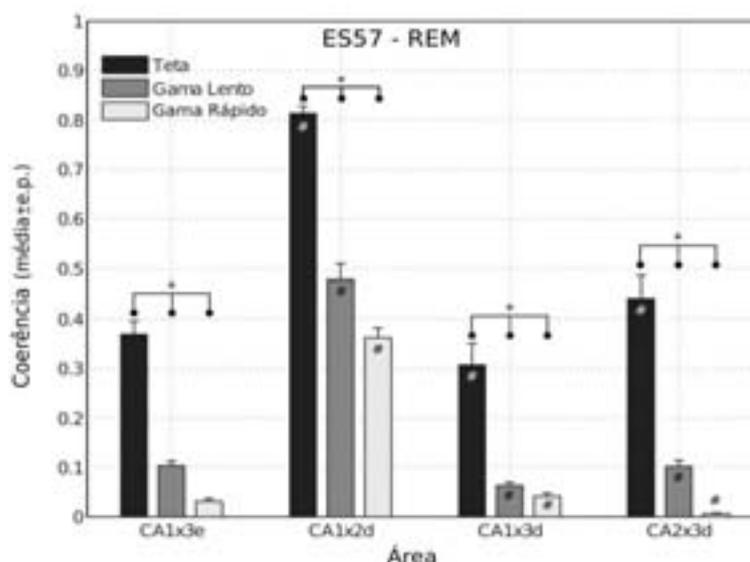


Gráfico 10 - Resultados estatísticos e comparações das estimativas de coerência para o animal ES57 em três bandas de frequência durante o sono REM. As comparações foram realizadas somente entre registros de pares de regiões ipsilaterais. # e \$ demonstram diferença significativa entre áreas ipsilaterais para uma mesma banda. O asterisco (*) indica diferença significativa entre bandas para uma mesma área, ambos com teste a posteriori de Bonferroni com $p < 0,05$. Os valores exatos podem ser consultados no Apêndice E.

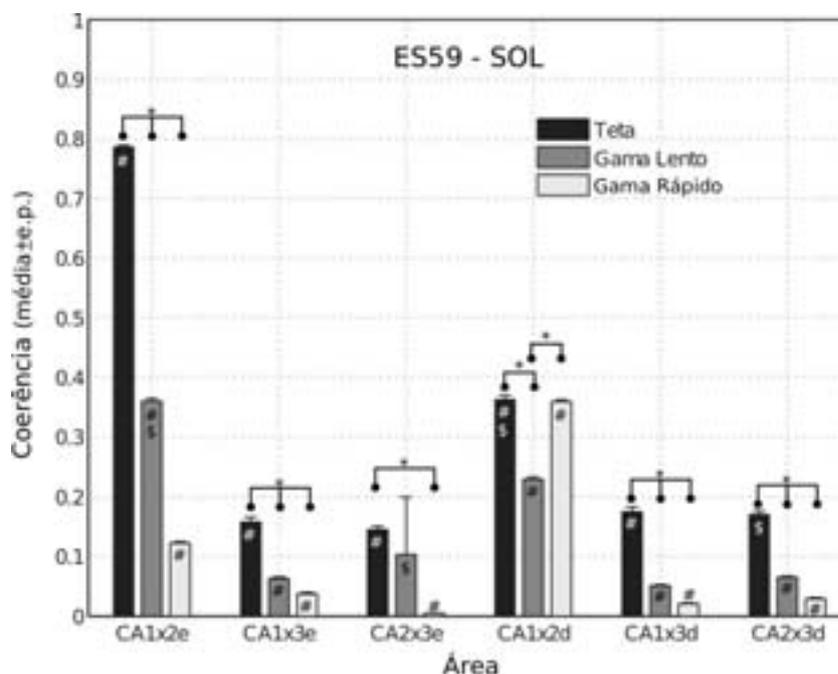


Gráfico 11 - Resultados estatísticos e comparações das estimativas de coerência para o animal ES59 em três bandas de frequência durante o SOL. As comparações foram realizadas somente entre registros de pares de regiões ipsilaterais. # e \$ demonstram diferença significativa entre áreas ipsilaterais para uma mesma banda. O asterisco (*) indica diferença significativa entre bandas para uma mesma área, ambos com teste a posteriori de Bonferroni com $p < 0,05$. Os valores exatos podem ser consultados no Apêndice E.

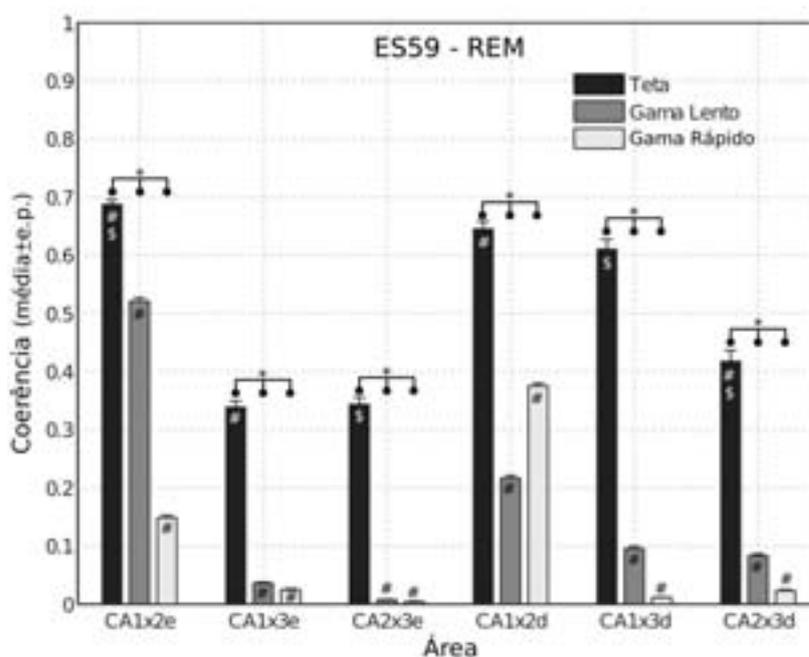


Gráfico 12 - Resultados estatísticos e comparações das estimativas de coerência para o animal ES59 em três bandas de frequência durante o sono REM. As comparações foram realizadas somente entre registros de pares de regiões ipsilaterais. # e \$ demonstram diferença significativa entre áreas ipsilaterais para uma mesma banda. O asterisco (*) indica diferença significativa entre bandas para uma mesma área, ambos com teste a posteriori de Bonferroni com $p < 0,05$. Os valores exatos podem ser consultados no Apêndice E.

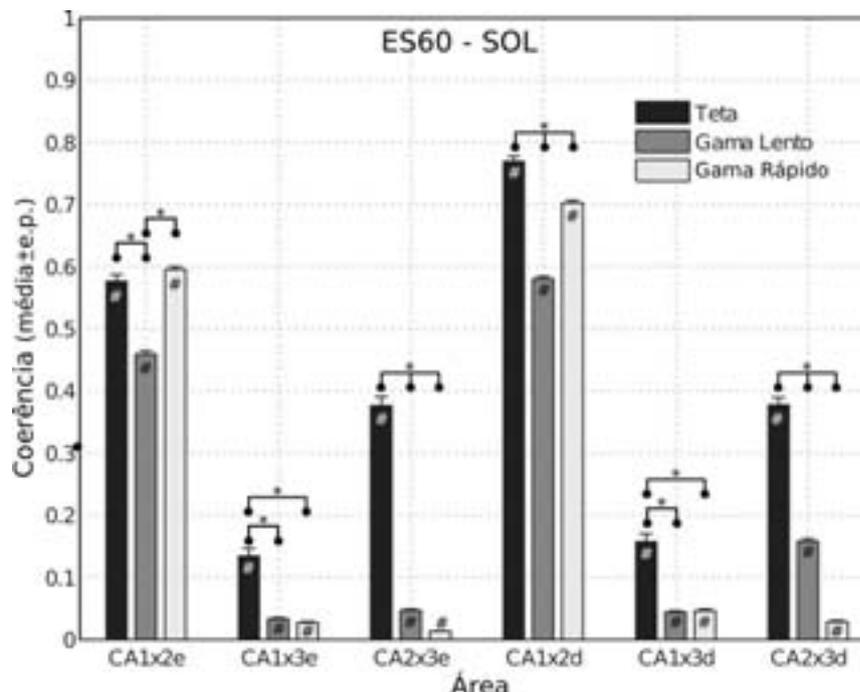


Gráfico 13 - Resultados estatísticos e comparações das estimativas de coerência para o animal ES60 em três bandas de frequência durante o SOL. As comparações foram realizadas somente entre registros de pares de regiões ipsilaterais. # demonstra diferença significativa entre áreas ipsilaterais para uma mesma banda. O asterisco (*) indica diferença significativa entre bandas para uma mesma área, ambos com teste a posteriori de Bonferroni com $p < 0,05$. Os valores exatos podem ser consultados no Apêndice E.

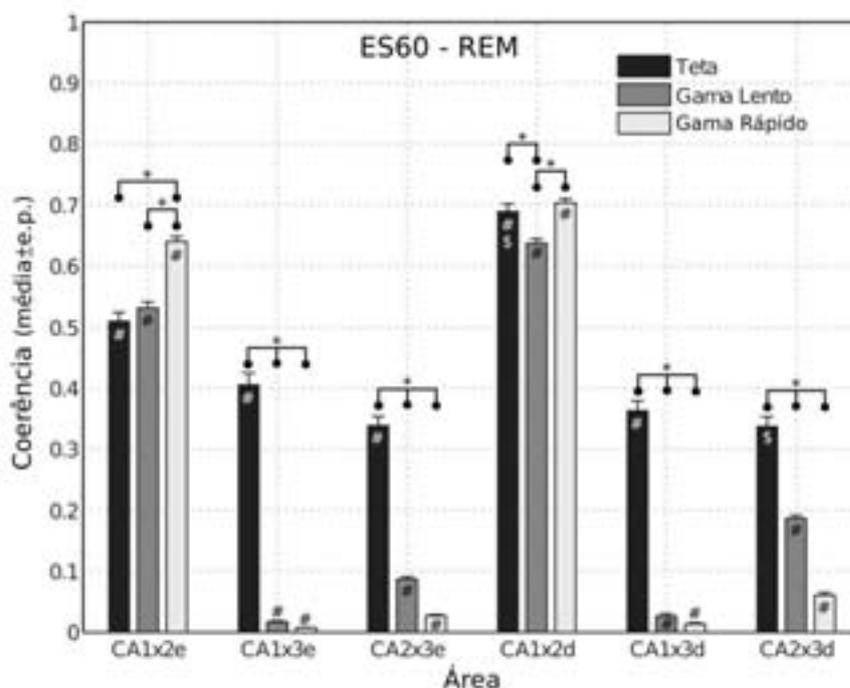


Gráfico 14 - Resultados estatísticos e comparações das estimativas de coerência para o animal ES60 em três bandas de frequência durante o sono REM. As comparações foram realizadas somente entre registros de pares de regiões ipsilaterais. # e \$ demonstram diferença significativa entre áreas ipsilaterais para uma mesma banda. O asterisco (*) indica diferença significativa entre bandas para uma mesma área, ambos com teste a posteriori de Bonferroni com $p < 0,05$. Os valores exatos podem ser consultados no Apêndice E.

No gama rápido todas as comparações foram significativas, sendo a coerência entre CA1-CA2 maior que CA2-CA3 que por sua vez foi maior que em CA1-CA3 em ambos os estágios para todos os animais e estágios (Gráficos 9 a 14).

As comparações entre as três bandas para cada par de regiões mostrou alguns resultados conflitantes entre os animais. No animal ES57 o teta foi significativamente superior ao gama lento que foi por sua vez superior ao gama rápido, em todos os casos nos dois estágios (apenas entre CA1-CA2 direito a interação não foi significativa, mas ambos os efeitos foram significativos, Gráficos 9 e 10).

No animal ES59 não houve diferenças entre teta e gama lento e gama lento e gama rápido entre CA2-CA3 esquerdo durante o SOL. No hemisfério direito não houve diferença significativa entre teta e gama rápido entre CA1-CA2 no SOL. No sono REM todas as diferenças foram significativas (Gráficos 11 e 12)

Já no animal ES60 a coerência no teta não foi superior ao gama lento em CA1-CA2 no hemisfério esquerdo durante o sono REM e ao gama rápido no hemisfério direito durante o SOL. Não houve diferenças entre gama lento e gama rápido entre CA1-CA3 em ambos os hemisférios do animal ES60 no SOL (Gráficos 13 e 14).

5. Discussão

“O jogo da ciência é, em princípio, interminável. Quem decida, um dia, que os enunciados científicos não mais exigem prova e podem ser vistos como definitivamente verificados, retira-se do jogo.”

Karl Raimund Popper - A lógica da pesquisa científica

As técnicas utilizadas neste trabalho, em especial a construção e implante de matrizes de multieletródos em animais vivos, com registro simultâneo de potenciais de campo local em dezenas de pontos e com registro de padrões de disparo de dúzias de células são relativamente novas na neurociência. Os primeiros relatos de experimentos com matrizes de multieletródos datam de cerca de 20 anos atrás (KRALIK et al., 2001; LEBEDEV; NICOLELIS, 2006; MILLER; WILSON, 2008; NICOLELIS; RIBEIRO, 2002). No Brasil, este trabalho é, senão o primeiro a ser concluído, um dos primeiros realizados com estas técnicas. No momento de início desta pesquisa não havia no Brasil, nem mesmo na América Latina, sequer um único equipamento de registro como o que foi utilizado, capaz de registrar simultaneamente disparos celulares e potenciais de campo local em dezenas de canais. Também era desconhecida por aqui a técnica de construção de matrizes de multieletródos, sendo o laboratório de Neurociências Cesar Timo-Iaria, parceria entre a Associação Alberto Santos Dumont para Apoio à Pesquisa (AASDAP) e o Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês (IEP-HSL) o pioneiro a estabelecer esta técnica na América do Sul.

Com o intuito de minimizar o número de animais sacrificados, sempre que possível, todos os animais utilizados apenas para testes comportamentais foram reutilizados por outros estudantes do laboratório para aprendizagem das técnicas de perfusão e histologia de seus respectivos projetos. Devido a uma série de problemas técnicos e de tempo de execução, os experimentos comportamentais realizados não foram incluídos na presente tese.

As primeiras cirurgias foram realizadas sem retirada da dura-máter. Esta abordagem foi escolhida por causar menor exposição do encéfalo ao ambiente externo, preservando o tecido, a circulação sanguínea local e suas funções. Entretanto, devido à resistência criada pela meninge, à flexibilidade dos fios e à pressão que exercem como um feixe de espaçamento relativamente pequeno (300 µm nestes testes iniciais), durante o implante observou-se grande pressão sobre a meninge e o encéfalo, sendo que o tecido ia lentamente cedendo e afundando, sem que houvesse a

perfuração da meninge com penetração da matriz no tecido nervoso (Figuras 16 e 23). Nas cirurgias subseqüentes este problema foi resolvido utilizando-se matrizes com espaçamentos maiores, fios sobrepostos (ver Tabela 1) e retirando-se a meninge (Figuras 17, 25 e 26). Este processo pode eventualmente expor em demasia o tecido nervoso, bem como mudar a pressão e a circulação localmente. Entretanto, como a estrutura em questão localiza-se profundamente no cérebro, abaixo do corpo caloso, estes possíveis fatores de interferência ficam minimizados neste estudo. Ademais, foram tomadas precauções durante a cirurgia, como a penetração da matriz esquerda imediatamente após a retirada da meninge e a proteção do hemisfério direito com gelatina absorvível e gel hidratante, até o momento de inserção da segunda matriz.

Os resultados obtidos nas etapas iniciais, de construção de eletrodos, implantes cirúrgicos, eutanásia, perfusão, histologia e localização de canais foram satisfatórios. Foram obtidos implantes que atingiram simultaneamente CA3, CA2 e CA1 biltaralmente, conforme necessário para conclusão dos objetivos principais do estudo.

Os resultados da análise de sinais eletrofisiológicos revelaram uma série de dificuldades, em grande parte devido à inexperiência do grupo com as técnicas utilizadas. Que tenhamos conhecimento, este trabalho é o primeiro a ser concluído no Brasil com construção de matrizes de multieletrodos e registro simultâneo de potenciais de campo local e disparos celulares em diversos pontos do cérebro no animal em livre movimentação. O problema mais grave encontrado foi a ocorrência de ruído, em especial em épocas de movimentação do animal. Diversas precauções foram tomadas na tentativa de se evitar este problema, razoavelmente comum na área da eletrofisiologia e de solução não trivial. Cada matriz foi cuidadosamente testada para certificação de que não havia curto-circuito e de que estava bem aterrada. A caixa de registro possuía blindagem metálica, formando um gaiola de Faraday, bem como os pré-amplificadores foram aterrados à gaiola. Ainda assim, não foi possível eliminar o ruído, que chegou a contaminar grande parte das épocas de vigília, prejudicando os resultados consideravelmente.

A técnica de ACI, utilizada na tentativa de se eliminar o ruído, mostrou-se parcialmente eficaz. Em épocas em que o ruído não é muito intenso, a ACI forneceu bons resultados, como pode-se observar nas Figuras 37 e 38. A correlação entre sinais de potenciais de campo local em pontos próximos (centenas de micrômetros, com é o caso nestes experimentos) é alta, conforme esperado

dada a natureza abrangente do sinal. Na Figura 37, a esquerda, em azul, pode-se confirmar esta afirmação, no quadro superior, em que a correlação entre dois canais sem ruído (canal 1 e 2 na figura) é próxima de $r = 0,9$. No segundo quadro, a correlação entre canais com ruído, porém em trecho limpo, a correlação é semelhante. A direita, em vermelho, pode-se observar a correlação entre os dois canais limpos em trecho que havia ruído em demais canais, também ao redor de $0,9$. No caso de dois canais afetados a correlação subiu para quase $1,0$, dado que o ruído domina a variabilidade do sinal e é simultâneo e idêntico nos canais afetados. Na coluna da direita, os dois painéis inferiores revelam a baixa correlação entre canais limpos (1 e 2) e sujos (3 e 4) em trechos com ruído, em torno de $0,1$. Após a ACI (Figura 38), pode-se observar que a correlação entre os canais limpos em trechos limpos e sujos (fileira superior) se manteve, indicando que a ACI não afetou outras características do sinal. Na coluna da direita, em vermelho, a segunda linha mostra que a correlação excessiva devido ao ruído simultâneo em dois canais diminuiu do quase $1,0$ para $0,87$, próximo dos valores encontrados entre canais sem problemas de ruído. Por fim, a correlação entre canais que antes estavam contaminados com ruído e canais que estavam limpos, que antes da ACI era de cerca de $0,1$ subiu para cerca de $0,7$. Estes resultados indicam que a ACI foi eficiente em remover o ruído dos canais contaminados tornando-os mais semelhantes aos canais limpos e sem deturpar estes últimos, dado que a correlação entre eles se manteve.

Entretanto, em épocas que continham ruído de grande amplitude e longa duração, a ACI remove praticamente todo o sinal registrado, deixando um trecho praticamente plano no sinal (Figura 36, painel inferior). Com o descarte destes trechos a quantidade de sinal de períodos de vigília registrados diminuiu drasticamente. Esta diminuição impossibilitou a realização das análises de coerência durante estes estados, que portanto foi realizada apenas para os estados de SOL e sono REM. Análises mais finas que podem ser conduzidas futuramente, como a relação temporal entre disparos unitários e os potenciais de campo local também ficaram dificultadas durante os períodos de vigília.

Assim sendo, concluímos que é imperativo investigar em maiores detalhes a causa da presença deste ruído, possibilitando a resolução desta questão antes da condução de novos experimentos com o mesmo equipamento. Alguns testes neste sentido foram realizados durante a execução desta tese e apesar de ainda não serem totalmente conclusivos, apontam para a diferença de impedância de entrada do pré-amplificador (headstage) e dos eletrodos como possível causa. O ideal é que a impedância de entrada do equipamento seja várias ordens de magnitude superior à

impedância dos eletrodos. No nosso caso, os eletrodos possuem impedância ao redor de 1,0 M Ω e o pré-amplificador ao redor de 22,0 M Ω , ambos a 1,0 kHz. Esta diferença está muito abaixo do recomendado, ao redor de 100x ou mais (NELSON et al., 2008). Esta hipótese pode ser testada utilizando-se pre-amplificadores mais modernos, com impedância de entrada maior que 1,0 G Ω , que fornece melhores resultados (NELSON et al., 2008).

Os resultados de padrões de disparo devem ser interpretados com cautela, levando em consideração questões específicas da classificação dos disparos em unidades. Grande parte da literatura hipocampal em animais utiliza tetrodos, que fornecem separação mais precisa entre os diversos disparos registrados por um mesmo conjunto de quatro fios por meio da diferença no formato da onda registrada entre eles. Isto ocorre pois as quatro pontas necessariamente se localizam a distâncias distintas da célula em questão, afetando levemente o formato da onda registrada (GRAY et al., 1995). Durante a condução desta tese foram aprendidas as técnicas para construção e implante de tetrodos no laboratório do Prof. Dr. Pedro Maldonado, na Universidade do Chile. Entretanto, os mesmos não foram utilizados neste trabalho por questões técnicas, dado que não estão disponíveis no laboratório todos os equipamentos necessários. Ainda assim, as técnicas aqui utilizadas, i.e., registro com eletrodos individuais (single wires) e classificação de disparos (spike sorting) por “template matching” e ACP foi utilizada com sucesso em diversos estudos anteriores, incluindo registros hipocampais (PEREIRA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2004; RIBEIRO; NICOLELIS, 2004). A questão da classificação de disparos em unidades é tema atual de longos debates e controvérsias, havendo diversas técnicas atualmente disponíveis (FEE; MITRA; KLEINFELD, 1996; HARRIS et al., 2000; LEWICKI, 1998; QUIAN QUIROGA; NADASDY; BEN-SHAUL, 2004), mas ainda faltam estudos que de fato tenham comparado se a utilização de uma ou outra técnica de classificação influencia nos resultados estatísticos posteriormente obtidos.

A quantidade de unidades isoladas em cada área e animal variou muito (Tabela 3), em parte ao posicionamento da matriz no estereotáxico, que é feito de maneira manual, e também em parte a possíveis problemas técnicos. No animal ES59, por motivos de causa técnica ainda não muito bem esclarecidos (ver Tabela 1 do Apêndice A, que mostra os canais excluídos por problemas nos potenciais de campo local). Neste animal, todos os canais com problemas estavam no hemisfério direito, e foram registradas muito poucas unidades neste mesmo hemisfério, apesar de os resultados

histológicos evidenciarem diversos eletrodos bem próximos da camada piramidal (exemplos na Figura 26).

A análise da taxa de disparos unitários (Gráfico 2) durante o ciclo sono-vigília revelou perfil semelhante entre as três áreas, sendo o perfil das células de CA1 e CA2 muito próximo durante todos os estágios, enquanto taxas um tanto quanto reduzidas foram observadas em CA3 de maneira geral. Nas três áreas as taxas foram superiores na vigília, especialmente na vigília ativa, quando comparada ao estados de sonolência e sono (tanto SOL quanto sono REM). Este perfil que, nem sempre é significativo, é um indício que de fato a atividade neural diminui no hipocampo durante o sono, ao menos em situações de repouso e sem ocorrência de eventos comportamentalmente salientes. Estatisticamente, apenas durante os estágios de AL e REM foram encontradas diferenças significativas entre áreas (ver Gráfico 2, diferenças indicadas por #), sendo a taxa em CA3 inferior à CA1 e não havendo diferenças significativas com relação a CA2. Este resultado se deve provavelmente ao pequeno número de unidades registradas em CA2 (10) quando comparado a CA1 (39) e CA3 (74), uma vez que o perfil em CA2 e CA1 é muito parecido. A análise do padrão de cada área ao longo do ciclo revelou que a taxa de disparo em CA1 é significativamente maior na vigília ativa quando comparada a todos os demais estágios, com exceção da AL. A taxa de disparo é maior na AL se comparada a todos os demais estágios, com exceção da VA. Não foram encontradas diferenças significativas em CA2, apesar do perfil muito semelhante a CA1, provavelmente devido ao número de unidades registradas em cada região, bem menor em CA2 (10 unidades). Em CA3 a taxa na vigília ativa é significativamente maior que em todos os demais estágios e no REM significativamente menor. Estes resultados são um primeiro indício de diferença funcional entre estas regiões ao longo do ciclo, uma vez que a taxa de disparo é um dos mecanismos de codificação neural historicamente mais estudado (FEDER; RANCK, 1973; RANCK, 1973). Entretanto, a interpretação deste resultado deve ser feita com cautela, pois a taxa de disparo sabidamente aumenta com a apresentação de estímulos sensoriais salientes, o que não foi realizado nestes experimentos. Ademais, a média calculada em um largo período de tempo não revela os padrões temporais mais finos existentes durante o período de análise.

Para se avaliar estas questões, foi então calculado a média dos intervalos entre disparos (Gráfico 3). Este cálculo permite avaliar não somente a quantidade de disparos em relação à duração de cada estágio, mas também a relação temporal entre eles. De maneira geral (com exceção de CA2 durante o SOL e o REM), os intervalos estão entre a faixa dos 100 a 250 ms, revelando que as

células do hipocampo disparam em intervalos aproximados ao período do ritmo teta. Interessantemente, foi encontrado perfil distinto para cada área examinada. CA3 possui intervalos menores (abaixo dos 100 ms) que CA1 (até 300-350 ms) e CA2 (até cerca de 700-800 ms) para todos os estágios. Entretanto, esta diferença é significativa apenas para o SOL e o sono REM. Nestes estágios os intervalos em CA2 são significativamente maiores que em CA3 e CA1, chegando em torno dos 650 ms no SOL e 750 ms no sono REM. Em resumo, durante os estágios de sono observou-se intervalos mais prolongados entre os disparos de CA2 e mais curtos em CA3. Isto pode indicar uma diferença funcional entre as alças mais ativas durante a vigília e o sono, sendo talvez a participação de CA2 diferenciada entre vigília e sono pelos intervalos entre disparos. Os disparos curtos em CA3 durante o sono estão relacionados às oscilações das sharp-waves (BUZSÁKI, 1986), e resta saber qual a influência destas oscilações de altíssima frequência em CA2. Neste trabalho não foi possível investigar estas questões, pois o filtro analógico do sistema de registro atenua frequências a partir dos 170 Hz, estando as sharp-waves acima desta faixa. Uma possibilidade para o aumento dos intervalos em CA2 durante o SOL poderia ser a diminuição do tônus colinérgico durante este estado. Entretanto, intervalos aumentados também foram observados em CA2 durante o sono REM, quando o tônus colinérgico é alto, semelhante ao da vigília, na qual os intervalos foram menores. Assim sendo, o tônus colinérgico não parece ser a causa das variações nos intervalos de disparo em CA2. Futuros experimentos tendo como alvo a neurotransmissão por substância P e adenosina podem ser úteis para se aprofundar estas questões, assim como análises mais finas avaliando-se cada unidade registrada ao longo do tempo, o que pode ser realizado com os dados já coletados.

Uma característica típica das células hipocampais é a ocorrência de disparos em salvas (RANCK, 1973), i.e., disparos consecutivos com intervalos muito curtos. Diversas definições de quanto seria o intervalo entre disparos hipocampais que poderiam ser considerados salvas estão presentes na literatura, variando entre 5 e 25 ms (BEAN, 2007; HARRIS et al., 2001; LISMAN, 1997; RANCK, 1973). Adotamos aqui um critério intermediário de 10 ms como intervalo máximo entre disparos consecutivos para que fossem considerados como uma salva. Este intervalo está dentro da faixa descrita na literatura como coincidente com a constante de tempo da membrana¹⁹, o

¹⁹ A constante de tempo é importante para que potenciais pós-sinápticos, tanto excitatórios quanto inibitórios, possam exercer efeitos somatórios na célula pós-sináptica, influenciando as oscilações do potencial de

período do ritmo gama e a janela de tempo da plasticidade sináptica (HARRIS et al., 2003). Isto é importante pois foi sugerido que disparos consecutivos em salvas com intervalos nesta faixa de tempo influenciem o disparo da célula pós-sináptica por facilitar a somatória dos potenciais excitatórios/inibitórios pós-sinápticos consecutivos (HARRIS et al., 2003; LISMAN, 1997). A proporção encontrada de salvas para disparos simples foi em geral abaixo de 1%, especialmente em CA1. Esta proporção aumenta, em especial durante o sono de ondas lentas, efeito mais forte em CA3, chegando ao redor de 6,5-7,5% (Gráfico 4). O valor em CA3 durante o SOL é significativamente maior que em CA1 apenas. Este resultado revela que células em CA3 são mais propensas a disparar em salvas durante o SOL, o que pode ter reflexos em processos de consolidação de memórias (RIBEIRO et al., 2004; WILSON; MCNAUGHTON, 1994). As fortes oscilações de alta frequência (sharp-waves) que são encontradas nos potenciais de campo local durante este estágio (BUZSÁKI, 1986) estão associadas a disparos sincronizados de grande quantidade de células (CSICSVARI et al., 2000; YLINEN et al., 1995). Estes disparos em salvas podem aumentar a eficiência de transmissão sináptica ao induzirem a liberação de maior quantidade de neurotransmissores na fenda sináptica e também possibilitando a somatória de potenciais excitatórios pós-sinápticos, facilitando assim que as células pós-sinápticas atinjam seu limiar de disparo. Os disparos em salvas em CA3 também podem ter papel importante em sincronizar o hipocampo como um todo, dadas as suas conexões com CA2 e CA1 bilateralmente. As salvas também podem ter papel diferenciado nesta região ao permitir a sincronização de diversas células por meio das projeções recorrentes existentes em CA3, fazendo com que a ativação de um pequeno grupo de células possa rapidamente propagar-se para células próximas conectadas por estas projeções CA3-CA3. Este mecanismo de ativação de um pequeno grupo de células levando a ativação maciça de uma rede mais abrangente foi proposto como modelo computacional para a consolidação e evocação de memórias (ROLLS, 2007). De maneira resumida, um pequeno grupo de células, ativado apenas por parte dos estímulos contextuais relacionados a certo evento poderiam ativar toda a rede envolvida na codificação do evento original, portanto fortalecendo a consolidação ou permitindo a evocação do evento original com base em apenas algumas pistas sensoriais (KESNER, 2007; NAKAZAWA et al., 2002). A quantidade de salvas em CA2, apesar de não ser significativamente diferente de CA1 e CA3, é superior a CA1 e inferior a CA3, especialmente no SOL. A não significância estatística pode novamente ser devida à pequena quantidade de unidades registradas nesta região. Levando isto em consideração, podemos hipotetizar que os resultados

membrana e portanto a probabilidade de disparo, conforme a voltagem na membrana se aproxima ou se afasta do limiar de disparo.

encontrados sejam indício de que CA2 possua papel importante na transmissão entre CA3 e CA1 durante o SOL por meio de um número elevado de disparos em salvas.

Avaliando a quantidade de disparos presentes em cada salva observou-se que a grande maioria das salvas, em todos os estágios e regiões, é composta por pares de disparos. A análise estatística revelou que a quantidade de disparos é superior no SOL quando comparado ao REM, para todas as áreas avaliadas (Gráfico 5, diferença indicada por #).

Estudo com padrão de disparo em CA3 e CA1 durante períodos de atividade em um labirinto e períodos de imobilidade demonstrou que a maioria das salvas possui dois disparos, tanto em CA3 como em CA1, (TROPPE SNEIDER et al., 2006), o que está de acordo com nossos resultados. Entretanto, neste estudo foi encontrado grande proporção de salvas para disparos simples, até cerca de 20%, contra 1% em nossos resultados; os autores relataram também que a quantidade de salvas em CA1 é modulada pelo estado comportamental, sendo maior durante a imobilidade do que a atividade exploratória no labirinto. Estes achados são diferentes dos nossos para o ciclo sono vigília, nos quais a proporção de salvas para disparos simples em CA3 varia fortemente entre estágios e em CA1 não. Entretanto, estes resultados não são necessariamente contraditórios, pois o contexto comportamental é bem diferente, tendo os nossos animais sido registrados durante períodos de pouca novidade ambiental e durante o sono e a vigília, enquanto no estudo de 2006 os animais estavam treinados para correr em busca de recompensa e não foram registrados durante o sono. De maneira conjunta, os resultados demonstram que a quantidade de salvas muda diferencialmente entre CA3 e CA1 ao longo de estados comportamentais diversos como a busca de recompensa e o SOL.

Resumindo, as análises de disparos multiunitários revelaram padrões distintos entre CA1, CA2 e CA3 ao longo do ciclo sono-vigília, sendo as características mais marcantes os longos intervalos em CA2 durante o SOL e o sono REM e alta taxa de salvas em CA3 durante o SOL. Experimentos futuros podem ser realizados para verificar como são os perfis de disparos nas três regiões em resposta a eventos comportamentalmente salientes e ao processo de aprendizagem relacionados a estes eventos, adicionando importantes informações sobre o funcionamento do hipocampo durante a memória. Poderiam também ser realizadas análises posteriores nos dados já coletados para avaliar como os disparos em cada região afetam os potenciais de campo local nas

demais (spike triggered average), e se há diferenças nos resultados entre disparos simples e em salvas.

As análises de coerência demonstraram que entre os distintos hemisférios domina quase exclusivamente o ritmo teta (Gráficos 6, 7 e 8). Em um mesmo hemisfério, a coerência entre CA1 e CA2 é elevada tanto no teta quanto no gama lento e no gama rápido, apesar de algumas discrepâncias entre ratos e hemisférios (Gráficos 9 a 14 e tabelas do Apêndice E). Estes resultados inconsistentes podem ser devidos a distâncias variadas entre os eletrodos, efeitos residuais da ACI, à concatenação das janelas temporais após a deleção de trechos com ruído ou ao fato de que a amplitude e fase do ritmo teta e do gama variam no eixo septotemporal do hipocampo ao longo do tempo (LUBENOV; SIAPAS, 2009; SABOLEK et al., 2009). Análises mais finas são necessárias para se avaliar estas questões, calculando-se a coerência entre diversos pares de fios levando em consideração não somente a distância entre diversos eletrodos mas também o sentido em que se afastam uns dos outros, isto é, no eixo AP ou ML.

De maneira geral a magnitude da coerência no teta foi superior a coerência nas duas faixas do gama em todas as áreas analisadas. Excessão é a coerência entre CA1-CA3 no hemisfério direito do animal ES57, em que a coerência no teta foi menor que nas duas faixas do gama durante o SOL (Gráfico 9). No animal ES59 o teta não foi estatisticamente superior ao gama rápido entre CA1-CA2 direito durante o SOL (Gráfico 11) e no animal ES60 no hemisfério esquerdo, também durante o SOL (Gráfico 13). Nestes dois últimos casos, o que ocorreu foi um aumento considerável da coerência no gama rápido, e não uma diminuição no teta.

Importante destacar que entre CA1 e CA2 as coerências, além de elevadas no teta, conforme esperado dadas as aferências de CA2 e a grande amplitude do teta em CA1, foram elevadas também nas duas faixas do gama (Gráficos 9 a 14). Em alguns casos, a coerência no gama rápido foi estatisticamente indiferente da coerência no teta (Gráficos 11, 13 e 14) e em um caso até mesmo superior (Gráfico 14). Estes resultados demonstram que independentemente da amplitude, a coerência no gama pode ser muito alta entre CA1 e CA2 nos dois hemisférios. Entre CA2 e CA3, além da coerência no teta, predominou a coerência no gama lento, que só não foi estatisticamente maior que no gama rápido no animal ES60 durante o SOL (Gráfico 13). Estes resultados revelam que as oscilações em CA2 são consistentes com CA1 e CA3 durante o teta e diferencialmente segregadas pelas faixas do gama. Ou seja, CA2 oscila coerentemente com CA1 no gama rápido e com CA3 no gama lento. Esta diferença pode ter impacto profundo na transmissão de impulsos

entre CA1 e CA3, bem como na comunicação córtico hipocampal. De fato, foi recentemente demonstrado que a coerência entre o CE e CA1 é elevada no gama rápido e entre o CE e CA3 no gama lento (COLGIN et al., 2009). Assim sendo, CA2 pode atuar de maneira anterógrada em CA1 por oscilações na faixa dos 90 Hz e de maneira retrógrada em CA3 na faixa do 40 Hz. Esta possibilidade já havia sido levantada por estudo com caracterização morfológica e eletrofisiológica dos interneurônios de CA2, que projetam tanto para CA1 quanto para CA3 e possuem padrões eletrofisiológicos distintos (MERCER; TRIGG; THOMSON, 2007). Esta possibilidade pode ser investigada com os dados coletados neste trabalho pela técnica de spike triggered average, que consiste em avaliar o impacto médio de disparos em uma região sob os potenciais de campo local em outra região. Isto é, o que ocorre nas oscilações em CA1 e CA3 após disparos em CA2.

Apesar de não terem sido realizadas comparações estatísticas entre os estágios do sono, o perfil demonstrado nos gráficos 9 a 14 evidencia a prevalência da coerência no teta no sono REM, sem diferenças aparentes no gama. Resta investigar qual o impacto de eventos comportamentalmente salientes na comunicação das regiões do corno de Ammon, dado que existem diversos estudos demonstrando diferenças nestes dois estágios para a consolidação de memórias (JI; WILSON, 2007; RIBEIRO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2002; WILSON; MCNAUGHTON, 1994).

6. Conclusão

Os resultados obtidos na presente tese são parte importante de um avanço técnico e científico em andamento no país, de relevância considerável para o futuro das pesquisas nacionais na área de concentração em neurociências, em específico no campo da eletrofisiologia em animais de experimentação. Estes resultados permitem que as mesmas técnicas sejam estabelecidas em estudos futuros sobre o hipocampo e também sobre outras áreas do sistema nervoso central, uma vez que as matrizes podem ser desenhadas e construídas de diferentes maneiras.

Os resultados de construção e implante de matrizes de eletrodos, remoção do encéfalo, histologia com alinhamento digital de fotografias e localização de canais demonstraram que é viável registrar bilateral e simultaneamente CA1, CA2 e CA3 no rato em livre movimentação. Dada a pequena extensão de CA2, cerca de 150 μm no sentido médio lateral, é um resultado considerável e talvez um dos motivos por este campo ter sido ignorado por tanto tempo. Este é o primeiro trabalho que temos conhecimento que realizou este feito, permitindo, portanto a aplicação destes métodos em uma gama de experimentos futuros sobre a função hipocampal em processos fisiológicos como a memória e patológicos como, por exemplo, a epilepsia. Estas matrizes podem ser implantadas e utilizadas em animais durante tarefas comportamentais diversas (GERLAI, 2001; LEE; HUNSAKER; KESNER, 2005; LEE; JERMAN; KESNER, 2005; LEE; KESNER, 2004a; b), em combinação com métodos farmacológicos (SCHENBERG; OLIVEIRA, 2008; SCHENBERG; SOARES; OLIVEIRA, 2005) e em modelos farmacológicos de indução de estados convulsivos em animais, como o que utiliza o agonista muscarínico pilocarpina (SCORZA et al., 2009).

Os resultados obtidos na etapa de análise de padrões eletrofisiológicos no hipocampo revelaram que CA2 possui padrão de disparo estatisticamente diferente de CA3 e CA1. Os intervalos entre disparos em CA2 são especialmente longos durante o sono, tanto de ondas lentas quanto REM, reforçando a idéia de que CA2 é um campo distinto dos demais e que deve receber mais atenção das pesquisas sobre a função do hipocampo. Corrobora esta interpretação o resultado obtido com análise de coerência, mostrando que CA2 possui coerência elevada com CA1 e CA3 nas faixas de frequência do ritmo teta e também no gama. Em especial a coerência entre CA2 e CA1 é elevada nas três frequências, sendo que o gama rápido, elevado neste caso, é quase zero nas

coerências entre CA2-CA3 e CA1-CA3. Dado que recentemente foi demonstrado que as duas faixas do gama permitem a comunicação diferencial do CE com CA3 e CA1 (COLGIN et al., 2009), estes resultados indicam que CA2 possa modular de forma independente a comunicação do córtex entorrinal com os demais campos do corno de Ammon por meio das distintas frequências da banda gama. Assim sendo, CA2 pode atuar de maneira retrógrada em CA3 via interações no teta e no gama lento, enquanto de maneira anterógrada em CA1 via oscilações na faixa do teta e do gama rápido, comprovando que CA2 é um importante modulador da função hipocampal.

7. Referências²⁰

AGSTER, K. e BURWELL, R. D. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. Hippocampus. 2009.

ANDERSEN, M. L., NASCIMENTO, D. C., MACHADO, R. B., ROIZENBLATT, S., MOLDOFSKY, H. e TUFIK, S. Sleep disturbance induced by substance P in mice. Behavioural Brain Research, v.167, n.2, p.212-8. 2006.

ANDERSEN, P., SOLENG, A. F. e RAASTAD, M. The hippocampal lamella hypothesis revisited. Brain Research, v.886, n.1-2, p.165-171. 2000.

ARAI, A., KESSLER, M. e LYNCH, G. The effects of adenosine on the development of long-term potentiation. Neuroscience Letters, v.119, n.1, p.41-4. 1990.

ASERINSKY, E. e KLEITMAN, N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. Science, v.118, n.3062, Sep 4, p.273-4. 1953.

BARR, A. M., YOUNG, C. E., PHILLIPS, A. G. e HONER, W. G. Selective effects of typical antipsychotic drugs on SNAP-25 and synaptophysin in the hippocampal trisynaptic pathway. International Journal Of Neuropsychopharmacology, v.9, n.4, p.457-463. 2006.

BARTESAGHI, R. e GESSI, T. Parallel activation of field CA2 and dentate gyrus by synaptically elicited perforant path volleys. Hippocampus, v.14, n.8, p.948-63. 2004.

BARTESAGHI, R., MIGLIORE, M. e GESSI, T. Input-output relations in the entorhinal cortex-dentate-hippocampal system: evidence for a non-linear transfer of signals. Neuroscience, v.142, n.1, p.247-65. 2006.

BASHEER, R., HALLDNER, L., ALANKO, L., MCCARLEY, R. W., FREDHOLM, B. B. e PORKKA-HEISKANEN, T. Opposite changes in adenosine A1 and A2A receptor mRNA in the rat following sleep deprivation. Neuroreport, v.12, n.8, Jun 13, p.1577-80. 2001.

BASTIAANSEN, M. e HAGOORT, P. Event-induced theta responses as a window on the dynamics of memory. Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior, v.39, n.4-5, p.967-92. 2003.

²⁰ De acordo com a Associação Brasileira de Normas e Técnicas. NBR 6023.

BATTAGLIA, F., SUTHERLAND, G. e MCNAUGHTON, B. L. Hippocampal sharp wave bursts coincide with neocortical "up-state" transitions. Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY), v.11, n.6, p.697-704. 2004.

BAUDRY, M. e LYNCH, G. Remembrance of arguments past: how well is the glutamate receptor hypothesis of LTP holding up after 20 years? Neurobiology of Learning and Memory, v.76, n.3, p.284-97. 2001.

BEAN, B. The action potential in mammalian central neurons. Nature Reviews Neuroscience, v.8, n.6, p.451-465. 2007.

BENES, F. M., LIM, B., MATZILEVICH, D., SUBBURAJU, S. e WALSH, J. P. Circuitry-based gene expression profiles in GABA cells of the trisynaptic pathway in schizophrenics versus bipolars. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.105, n.52, p.20935-20940. 2008.

BENNETT, M. V. e PEREDA, A. Pyramid power: principal cells of the hippocampus unite! Brain Cell Biology, v.35, n.1, p.5-11. 2006.

BERGER, H. Über das elektrenkephalogramm des Menschen. Arch Psychiatr Nervenkr, v.87, p.527-70. 1929.

BERGER, T. W. e FROTSCHER, M. Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: an immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. Journal of neurocytology, v.23, n.1, p.61-74. 1994.

BERNARD, C. e WHEAL, H. V. Model of local connectivity patterns in CA3 and CA1 areas of the hippocampus. Hippocampus, v.4, n.5, p.497-529. 1994.

BLAND, B. H. e ODDIE, S. D. Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. Behavioural Brain Research, v.127, n.1-2, p.119-36. 2001.

BLISS, T. V. e COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature, v.361, n.6407, p.31-9. 1993.

BLISS, T. V. e LOMO, T. Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. The Journal of Physiology, v.207, n.2, p.61P. 1970.

BLISSITT, P. A. Sleep, memory, and learning. J Neurosci Nurs, v.33, n.4, Aug, p.208-15. 2001.

BORHEGYI, Z. e LERANTH, C. Substance P innervation of the rat hippocampal formation. The Journal of Comparative Neurology, v.384, n.1, p.41-58. 1997.

BORN, J., RASCH, B. e GAIS, S. Sleep to remember. The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry, v.12, n.5, p.410-24. 2006.

BORTOLOTTO, Z. A., NISTICO, R., MORE, J. C., JANE, D. E. e COLLINGRIDGE, G. L. Kainate receptors and mossy fiber LTP. NeuroToxicology, v.26, n.5, p.769-77. 2005.

BOULANGER, L. M., LOMBROSO, P. J., RAGHUNATHAN, A., DURING, M. J., WAHLE, P. e NAEGELE, J. R. Cellular and molecular characterization of a brain-enriched protein tyrosine phosphatase. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.15, n.2, p.1532-44. 1995.

BRUCKNER, G., GROSCHE, J., HARTLAGE-ROBSAMEN, M., SCHMIDT, S. e SCHACHNER, M. Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. Journal of chemical neuroanatomy, v.26, n.1, p.37-50. 2003.

BRAGIN, A., JANDO, G., NADASDY, Z., HETKE, J., WISE, K. e BUZSAKI, G. Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.15, n.1 Pt 1, p.47-60. 1995.

BRENNER, S., SCHWARTZ, S. e MAQUET, P. To sleep, perchance to dream. Current Biology. 1998.

BURGESS, N. e O'KEEFE, J. The theta rhythm. Hippocampus, v.15, n.7, p.825-6. 2005.

BURWELL, R. D. The parahippocampal region: corticocortical connectivity. Annals of the New York Academy of Sciences, v.911, p.25-42. 2000.

BURWELL, R. D. e AMARAL, D. G. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. The Journal of Comparative Neurology, v.398, n.2. 1998.

BUZSÁKI, G. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. Hippocampus, v.15, n.7, p.827-40. 2005.

BUZSÁKI, G. Cycle 11. Oscillations in the Other Cortex: Navigation in Real and Memory Space. Rhythms of the Brain. 2006.

BUZSÁKI, G. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. Brain Research, v.398, n.2, p.242-52. 1986.

BUZSÁKI, G. The hippocampo-neocortical dialogue. Cerebral cortex (New York, NY : 1991), v.6, n.2, p.81-92. 1996.

BUZSÁKI, G. Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective. Journal of sleep research, v.7 Suppl 1, p.17-23. 1998.

BUZSÁKI, G. Theta oscillations in the hippocampus. Neuron, v.33, n.3, p.325-40. 2002.

BUZSÁKI, G. Neuroscience: neurons and navigation. Nature, v.436, n.7052, p.781-2. 2005a.

BUZSÁKI, G. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. Hippocampus, v.15, n.7, p.827-40. 2005b.

BUZSÁKI, G., CZOPF, J., KONDAKOR, I. e KELLENYI, L. Laminar distribution of hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat - current source density analysis, effects of urethane and atropine. Brain Research, v.365, n.1, Jan 1, p.125-137. 1986.

BUZSÁKI, G. e DRAGUHN, A. Neuronal oscillations in cortical networks. Science, v.304, n.5679, p.1926-9. 2004.

BUZSÁKI, G., LEUNG, L. W. e VANDERWOLF, C. H. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. Brain Research, v.287, n.2, p.139-71. 1983.

CAPORALE, N. e DAN, Y. Spike timing-dependent plasticity: a Hebbian learning rule. Annual Review of Neuroscience, v.31, p.25-46. 2008.

CENQUIZCA, L. A. e SWANSON, L. W. Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. The Journal of Comparative Neurology, v.497, n.1, p.101-14. 2006.

CENQUIZCA, L. A. e SWANSON, L. W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. Brain Research Reviews, v.56, n.1, p.1-26. 2007.

CHROBAK, J. J. e BUZSAKI, G. Operational dynamics in the hippocampal-entorhinal axis. Neuroscience and biobehavioral reviews, v.22, n.2, p.303-10. 1998.

COLGIN, L. L., DENNINGER, T., FYHN, M., HAFTING, T., BONNEVIE, T., JENSEN, O., MOSER, M. B. e MOSER, E. I. Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. Nature, v.462, n.7271, p.353-7. 2009.

CORKIN, S. What's new with the amnesic patient H.M.? Nature Reviews Neuroscience, v.3, n.2, p.153-60. 2002.

COUSENS, G. e OTTO, T. A. Induction and transient suppression of long-term potentiation in the peri- and postrhinal cortices following theta-related stimulation of hippocampal field CA1. Brain Research, v.780, n.1, p.95-101. 1998.

CRAVER, C. F. The making of a memory mechanism. Journal of the history of biology, v.36, n.1, p.153-95. 2003.

CSICSVARI, J., HIRASE, H., MAMIYA, A. e BUZSÁKI, G. Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave, associated population events. Neuron, v.28, n.2, p.585-594. 2000.

CSICSVARI, J., JAMIESON, B., WISE, K. D. e BUZSÁKI, G. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. Neuron, v.37, n.2, p.311-322. 2003.

DAVIS, H., DAVIS, P. A., LOOMIS, A. L., HARVEY, E. N. e HOBART, G. Changes in Human Brain Potentials during the Onset of Sleep. Science, v.86, n.2237, Nov 12, p.448-450. 1937.

DE MENDONÇA, A. e RIBEIRO, J. A. 2-Chloroadenosine decreases long-term potentiation in the hippocampal CA1 area of the rat. Neuroscience Letters, v.118, n.1, p.107-11. 1990.

DELORME, A. e MAKEIG, S. EEGLAB: an open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. Journal of Neuroscience Methods, v.134, n.1, p.9-21. 2004.

DIEKELMANN, S. e BORN, J. Slow-wave sleep takes the leading role in memory reorganization. Nature Reviews Neuroscience, v.11, n.3, p.c3-c3. 2010.

EGO-STENGEL, V. e WILSON, M. A. Spatial selectivity and theta phase precession in CA1 interneurons. Hippocampus, v.17, n.2, p.161-74. 2007.

EICHENBAUM, H. Neurobiology. The topography of memory. Nature, v.402, n.6762, p.597-9. 1999.

EICHENBAUM, H. Hippocampus: Mapping or memory? Current Biology, v.10, n.21, p.R785-R787. 2000.

EICHENBAUM, H. Hippocampus Cognitive Processes and Neural Representations that Underlie Declarative Memory. Neuron. 2004.

EICHENBAUM, H., DUDCHENKO, P., WOOD, E. e SHAPIRO, M. L. The Hippocampus, Memory, and Place Cells: Is It Spatial Memory or a Memory Space? NEURON-CAMBRIDGE MA-. 1999.

ENGEL, A. K., FRIES, P. e SINGER, W. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. Nature Reviews Neuroscience, v.2, n.10, p.704-16. 2001.

FORSTER, E., ZHAO, S. e FROTSCHER, M. Laminating the hippocampus. Nature Reviews Neuroscience, v.7, n.4, p.259-67. 2006.

FEDER, R. e RANCK, J. B. Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. II. Hippocampal slow waves and theta cell firing during bar pressing and other behaviors. Experimental Neurology, v.41, n.2, p.532-55. 1973.

FEE, M. S., MITRA, P. P. e KLEINFELD, D. Automatic sorting of multiple unit neuronal signals in the presence of anisotropic and non-Gaussian variability. Journal of Neuroscience Methods, v.69, n.2, p.175-88. 1996.

FISCHER, Y. The hippocampal intrinsic network oscillator. The Journal of Physiology, v.554, n.Pt 1, p.156-74. 2004.

FISCHER, Y. e DURR, R. Inhibitory control of intrinsic hippocampal oscillations? Brain Research, v.982, n.1, p.79-91. 2003.

FISCHER, Y., GERSHWILER, B. H. e THOMPSON, S. Activation of intrinsic hippocampal theta oscillations by acetylcholine in rat septo-hippocampal cocultures. The Journal of Physiology, v.519, n.2, p.405. 1999.

FORSTER, E., ZHAO, S. e FROTSCHER, M. Laminating the hippocampus. Nature Reviews Neuroscience, v.7, n.4, p.259-67. 2006.

FREUND, T. F. e BUZSÁKI, G. Interneurons of the hippocampus. Hippocampus, v.6, n.4, p.347-470. 1996.

FUJITA, Y. e SATO, T. Intracellular records from hippocampal pyramidal cells in rabbit during theta rhythm activity. Journal of Neurophysiology, v.27, n.6, Jan 1, p.1011-&. 1964.

GAIS, S. e BORN, J. Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101, n.7, p.2140-4. 2004.

GERLAI, R. Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. Behavioural Brain Research, v.125, n.1-2, p.269-77. 2001.

GILLIES, M. J., TRAUB, R. D., LEBEAU, F. E. N., DAVIES, C. H., GLOVELI, T., BUHL, E. H. e WHITTINGTON, M. A. A model of atropine-resistant theta oscillations in rat hippocampal area CA1. The Journal of Physiology, v.543, n.Pt 3, Sep 15, p.779-93. 2002.

GIUDITTA, A., AMBROSINI, M. V., MONTAGNESE, P., MANDILE, P., COTUGNO, M., GRASSI ZUCCONI, G. e VESCIA, S. The sequential hypothesis of the function of sleep. Behav Brain Res, v.69, n.1-2, Jul-Aug, p.157-66. 1995.

GOODRICH-HUNSAKER, N., HUNSAKER, M. e KESNER, R. The interactions and dissociations of the dorsal hippocampus subregions: how the dentate gyrus, CA3, and CA1 process spatial information. Behavioral Neuroscience, v.122, n.1, p.16-26. 2008.

GOULD, E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? Nature Reviews Neuroscience, v.8, n.6, p.481-8. 2007.

GOUTAGNY, R., JACKSON, J. e WILLIAMS, S. Self-generated theta oscillations in the hippocampus. Nature Neuroscience, p.1-3. 2009.

GRASTYAN, E., LISSAK, K., MADARASZ, I. e DONHOFFER, H. Hippocampal electrical activity during the development of conditioned reflexes. Electroencephalography and clinical neurophysiology, v.11, n.3, p.409-30. 1959.

GRAY, C. M., MALDONADO, P. E., WILSON, M. A. e MCNAUGHTON, B. L. Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex. Journal of Neuroscience Methods, v.63, n.1-2, p.43-54. 1995.

GROVE, E. A. e TOLE, S. Patterning events and specification signals in the developing hippocampus. Cerebral cortex (New York, NY : 1991), v.9, n.6, p.551-61. 1999.

HOLSCHER, C., ANWYL, R. e ROWAN, M. J. Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.17, n.16, p.6470-7. 1997.

HAAS, L. F. Hans Berger (1873-1941), Richard Caton (1842-1926), and electroencephalography. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, v.74, n.1, p.9. 2003.

HARRIS, K. D., CSICSVARI, J., HIRASE, H., DRAGOI, G. e BUZSAKI, G. Organization of cell assemblies in the hippocampus. Nature, v.424, n.6948, p.552-6. 2003.

HARRIS, K. D., HENZE, D. A., CSICSVARI, J., HIRASE, H. e BUZSAKI, G. Accuracy of tetrode spike separation as determined by simultaneous intracellular and extracellular measurements. Journal of Neurophysiology, v.84, n.1, p.401-14. 2000.

HARRIS, K. D., HIRASE, H., LEINEKUGEL, X., HENZE, D. A. e BUZSAKI, G. Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells. Neuron, v.32, n.1, p.141-9. 2001.

HARVEY, C. D., COLLMAN, F., DOMBECK, D. A. e TANK, D. W. Intracellular dynamics of hippocampal place cells during virtual navigation. Nature, v.461, n.7266, p.941-6. 2009.

HASSELMO, M. E. What is the function of hippocampal theta rhythm?--Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. Hippocampus, v.15, n.7, p.936-49. 2005.

HEBB, D. O. The organization of behavior: a neuropsychological theory, 2^ª ed. p.335. 1949.

HENZE, D. A., URBAN, N. N. e BARRIONUEVO, G. The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. Neuroscience, v.98, n.3, p.407-27. 2000.

HERRERAS, O., SOLIS, J. M., DELRIO, R. M. e LERMA, J. CHARACTERISTICS OF CA1 ACTIVATION THROUGH THE HIPPOCAMPAL TRISYNAPTIC PATHWAY IN THE UNANESTHETIZED RAT. Brain Research, v.413, n.1, p.75-86. 1987.

HUBEL, D. e WIESEL, T. N. RECEPTIVE FIELDS OF SINGLE NEURONES IN THE CATS STRIATE CORTEX. J Physiol-London, v.148, n.3, Jan 1, p.574-591. 1959.

HUGHES, J. R. Gamma, fast, and ultrafast waves of the brain: their relationships with epilepsy and behavior. Epilepsy Behav, v.13, n.1, Jul 1, p.25-31. 2008.

ISHIZUKA, N., COWAN, W. M. e AMARAL, D. G. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. The Journal of Comparative Neurology, v.362, n.1. 1995.

ISOMURA, Y., SIROTA, A., OZEN, S., MONTGOMERY, S., MIZUSEKI, K., HENZE, D. A. e BUZSAKI, G. Integration and segregation of activity in entorhinal-hippocampal subregions by neocortical slow oscillations. Neuron, v.52, n.5, p.871-82. 2006.

IZQUIERDO, I. e MEDINA, J. H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. Neurobiology of Learning and Memory, v.63, n.1, p.19-32. 1995.

JEFFERY, K. J. Integration of the sensory inputs to place cells: what, where, why, and how? Hippocampus, v.17, n.9, p.775-85. 2007.

JJ, D. e WILSON, M. A. Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. Nature Neuroscience, v.10, n.1, p.100-7. 2007.

JONES, B. e WITTER, M. P. Cingulate cortex projections to the parahippocampal region and hippocampal formation in the rat. Hippocampus, v.17, n.10, p.957-76. 2007.

JONES, B. E. From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. Trends in Pharmacological Sciences, v.26, n.11, Nov 1, p.578-86. 2005.

KAJIWARA, R., WOUTERLOOD, F. G., SAH, A., BOEKEL, A. J., BAKS-TE BULTE, L. T. e WITTER, M. P. Convergence of entorhinal and CA3 inputs onto pyramidal neurons and interneurons in hippocampal area CA1--an anatomical study in the rat. Hippocampus, v.18, n.3, p.266-80. 2008.

KAPLAN, M. S. e HINDS, J. W. Neurogenesis in adult rat - electron-microscopic analysis of light autoradiographs. Science, v.197, n.4308, p.1092-1094. 1977.

KAWAMURA, Y., MANITA, S., NAKAMURA, T., INOUE, M., KUDO, Y. e MIYAKAWA, H. Glutamate release increases during mossy-CA3 LTP but not during Schaffer-CA1 LTP. European Journal of Neuroscience, v.19, n.6, p.1591-1600. 2004.

KESNER, R. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY), v.14, n.11, p.771-81. 2007.

KIM, S. J. e LINDEN, D. J. Ubiquitous plasticity and memory storage. Neuron, v.56, n.4, p.582-92. 2007.

KIRK, I. J. e MACKAY, J. C. The role of theta-range oscillations in synchronising and integrating activity in distributed mnemonic networks. Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior, v.39, n.4-5, p.993-1008. 2003.

KIRK, I. J. e MCNAUGHTON, N. Supramammillary cell firing and hippocampal rhythmical slow activity. Neuroreport, v.2, n.11, p.723-5. 1991.

KISS, J., CSAKI, A., BOKOR, H., SHANABROUGH, M. e LERANTH, C. The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [³H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. Neuroscience, v.97, n.4, p.657-69. 2000.

KLAUSBERGER, T. e SOMOGYI, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. Science, v.321, n.5885, p.53-7. 2008.

KNIERIM, J. J., MCNAUGHTON, B. L. e POE, G. R. Three-dimensional spatial selectivity of hippocampal neurons during space flight. Nature Neuroscience, v.3, n.3, p.211-212. 2000.

KOCSIS, B. The effect of descending theta rhythmic input from the septohippocampal system on firing in the supramammillary nucleus. Brain Research, v.1086, n.1, p.92-7. 2006.

KOGANEZAWA, N., TAGUCHI, A., TOMINAGA, T., OHARA, S., TSUTSUI, K., WITTER, M. P. e IJIMA, T. Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. Neuroscience Research, v.61, n.2, p.172-81. 2008.

KOWALL, N. W., QUIGLEY, B. J., KRAUSE, J. E., LU, F., KOSOFKY, B. E. e FERRANTE, R. J. Substance P and substance P receptor histochemistry in human neurodegenerative diseases. Regulatory peptides, v.46, n.1-2, p.174-85. 1993.

KRALIK, J. D., DIMITROV, D. F., KRUPA, D. J., KATZ, D. B., COHEN, D. e NICOLELIS, M. A. L. Techniques for long-term multisite neuronal ensemble recordings in behaving animals. Methods, v.25, n.2, p.121-50. 2001.

KRAMAR, E. A., LIN, B., REX, C. S., GALL, C. M. e LYNCH, G. Integrin-driven actin polymerization consolidates long-term potentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.103, n.14, p.5579-84. 2006.

KRAMIS, R., VANDERWOLF, C. H. e BLAND, B. H. 2 types of hippocampal rhythmical slow activity in both rabbit and rat -relations to behavior and effects of atropine, diethyl-ether, urethane, and pentobarbital. Experimental Neurology, v.49, n.1, p.58-85. 1975.

LAPLAGNE, D., ESPINOSA-SITO, M. S., PIATTI, V., MORGENSTERN, N., ZHAO, C., VAN PRAAG, H., GAGE, F. H. e SCHINDER, A. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. PLoS Biology, v.4, n.12, p.e409. 2006.

LARRIVA-SAHD, J. Some contributions of Rafael Lorente de No to neuroscience: A reminiscence. Brain Research Bulletin. 2002.

LAUREYS, S. The neural correlate of (un)awareness: lessons from the vegetative state. Trends in Cognitive Sciences, v.9, n.12, Dec 1, p.556-9. 2005.

LAUREYS, S., OWEN, A. M. e SCHIFF, N. D. Brain function in coma, vegetative state, and related disorders. Lancet Neurol, v.3, n.9, Sep 1, p.537-46. 2004.

LEBEDEV, M. A. e NICOLELIS, M. A. L. Brain-machine interfaces: past, present and future. Trends in Neurosciences, v.29, n.9, p.536-46. 2006.

LEE, I., HUNSAKER, M. e KESNER, R. The role of hippocampal subregions in detecting spatial novelty. Behavioral Neuroscience, v.119, n.1, p.145-53. 2005.

LEE, I., JERMAN, T. S. e KESNER, R. Disruption of delayed memory for a sequence of spatial locations following CA1- or CA3-lesions of the dorsal hippocampus. Neurobiology of Learning and Memory, v.84, n.2, p.138-47. 2005.

LEE, I. e KESNER, R. Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. Hippocampus, v.14, n.3, p.301-10. 2004a.

LEE, I. e KESNER, R. Encoding versus retrieval of spatial memory: double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. Hippocampus, v.14, n.1, p.66-76. 2004b.

LEE, I., RAO, G. e KNIERIM, J. J. A double dissociation between hippocampal subfields: differential time course of CA3 and CA1 place cells for processing changed environments. Neuron, v.42, n.5, p.803-15. 2004.

LEE, M. G., CHROBAK, J. J., SIK, A., WILEY, R. G. e BUZSÁKI, G. Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. Neuroscience, v.62, n.4, Oct 1, p.1033-47. 1994.

LERANTH, C., CARPI, D., BUZSAKI, G. e KISS, J. The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: morphological basis of a feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm. Neuroscience, v.88, n.3, p.701-18. 1999.

LEVY, W. B. e STEWARD, O. Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. Brain Research, v.175, n.2, p.233-45. 1979.

LEWICKI, M. S. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. Network (Bristol, England), v.9, n.4, p.R53-78. 1998.

LIE, D., COLAMARINO, S., SONG, H., D[√]©SIR[√]©, L., MIRA, H., CONSIGLIO, A., LEIN, E. S., JESSBERGER, S., LANSFORD, H., DEARIE, A. e GAGE, F. H. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. Nature, v.437, n.7063, p.1370-5. 2005.

LISMAN, J. E. Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. Trends in Neurosciences, v.20, n.1, p.38-43. 1997.

LISMAN, J. E. The theta/gamma discrete phase code occurring during the hippocampal phase precession may be a more general brain coding scheme. Hippocampus, v.15, n.7, p.913-22. 2005.

LISMAN, J. E. e BUZSAKI, G. A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. Schizophrenia Bulletin, v.34, n.5, p.974-80. 2008.

LISMAN, J. E. e IDIART, M. Storage of 7 ± 2 short-term memories in oscillatory subcycles. Science, v.267, n.5203, p.1512-1515. 1995.

LLINÁS, R., RIBARY, U., CONTRERAS, D. e PEDROARENA, C. The neuronal basis for consciousness. Philos T Roy Soc B, v.353, n.1377, Jan 1, p.1841-1849. 1998.

LOPES DA SILVA, F. H., WITTER, M. P., BOEIJINGA, P. H. e LOHMAN, A. H. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. Physiological reviews, v.70, n.2, p.453-511. 1990.

LORENTE DE NÓ, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation on the study of the ammonic system. JOURNAL FUR PSYCHOLOGIE UND NEUROLOGIE, v.46, p.113-177. 1934.

LUBENOV, E. V. e SIAPAS, A. G. Hippocampal theta oscillations are travelling waves. Nature. 2009.

LÜTKEPOHL, H. Introduction to Multiple Time Series Analysis. Berlin: Springer Verlag. 1993

MAGLÓCZKY, Z., ACSÁDY, L. e FREUND, T. F. Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. Hippocampus, v.4, n.3, p.322-34. 1994.

MALENKA, R. C. e BEAR, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. Neuron, v.44, n.1, p.5-21. 2004.

MANN, E. O. e PAULSEN, O. Mechanisms underlying gamma ('40 Hz') network oscillations in the hippocampus--a mini-review. Progress in biophysics and molecular biology, v.87, n.1, p.67-76. 2005.

MANSEAU, F., DANIK, M. e WILLIAMS, S. A functional glutamatergic neurone network in the medial septum and diagonal band area. The Journal of Physiology, v.566, n.Pt 3, p.865-84. 2005.

MAQUET, P. The role of sleep in learning and memory. Science, v.294, n.5544, Nov 2, p.1048-52. 2001.

MAQUET, P. e RUBY, P. Psychology: insight and the sleep committee. Nature, v.427, n.6972, p.304-5. 2004.

MASQUELIER, T., HUGUES, E., DECO, G. e THORPE, S. J. Oscillations, phase-of-firing coding, and spike timing-dependent plasticity: an efficient learning scheme. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.29, n.43, p.13484-93. 2009.

MERCER, A., TRIGG, H. L. e THOMSON, A. M. Characterization of neurons in the CA2 subfield of the adult rat hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.27, n.27, p.7329-38. 2007.

MILLER, E. K. e WILSON, M. A. All my circuits: using multiple electrodes to understand functioning neural networks. Neuron, v.60, n.3, p.483-8. 2008.

MILLER, R. Cortico-hippocampal interplay: self-organizing phase-locked loops for indexing memory. Psychobiology(Austin), v.17, n.2, p.115-128. 1989.

MILLER, R. Cortico-hippocampal interplay and the representation of contexts in the brain, Âé. p.267. 1991.

MILNER, B., CORKIN, S. e TEUBER, H. Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of HM. Neuropsychologia, v.6, n.3, p.215-234. 1968.

MISHKIN, M., SUZUKI, W. A., GADIAN, D. G. e VARGHA-KHADEM, F. Hierarchical organization of cognitive memory. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences, v.352, n.1360, p.1461-7. 1997.

MITCHELL, J. B., MILLER, K. e DUNWIDDIE, T. V. Adenosine-induced suppression of synaptic responses and the initiation and expression of long-term potentiation in the CA1 region of the hippocampus. Hippocampus, v.3, n.1, p.77-86. 1993.

MITRA, P. P. e BOKIL, H. "Observed Brain Dynamics", Partha Mitra and Hemant Bokil, Oxford University Press, New York, 2008. <http://chronux.org/>. 2008.

MIZUMORI, S. J. Hippocampal place fields: a neural code for episodic memory? Hippocampus, v.16, n.9, p.685-90. 2006.

MIZUSEKI, K., SIROTA, A., PASTALKOVA, E. e BUZSAKI, G. Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop. Neuron, v.64, n.2, p.267-80. 2009.

MONTGOMERY, S., SIROTA, A. e BUZSÁKI, G. Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.28, n.26, p.6731-41. 2008.

MONTGOMERY, S. M. e BETANCUR, M. Behavior-dependent coordination of multiple theta dipoles in the hippocampus. Journal of ..., Jan 1. 2009.

MORRIS, R. G. M., MOSER, E. I., RIEDEL, G., MARTIN, S. J., SANDIN, J., DAY, M. e O'CARROLL, C. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences, v.358, n.1432, p.773-86. 2003.

NAKAGAMI, Y., SAITO, H. e MATSUKI, N. Optical recording of trisynaptic pathway in rat hippocampal slices with a voltage-sensitive dye. Neuroscience, v.81, n.1, p.1-8. 1997.

NAKAZAWA, K., QUIRK, M. C., CHITWOOD, R. A., WATANABE, M., YECKEL, M. F., SUN, L. D., KATO, A., CARR, C. A., JOHNSTON, D., WILSON, M. A. e TONEGAWA, S. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. Science, v.297, n.5579, p.211-8. 2002.

NELSON, M. J., POUGET, P., NILSEN, E. A., PATTEN, C. D. e SCHALL, J. D. Review of signal distortion through metal microelectrode recording circuits and filters. Journal of Neuroscience Methods, v.169, n.1, p.141-57. 2008.

NICOLELIS, M. A. L., DIMITROV, D. F., CARMENA, J. M., CRIST, R. E., LEHEW, G., KRALIK, J. D. e WISE, S. P. Chronic, multisite, multielectrode recordings in macaque monkeys. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.100, n.19, p.11041-6. 2003.

NICOLELIS, M. A. L., FANSELOW, E. E. e GHAZANFAR, A. A. Hebb's dream: the resurgence of cell assemblies. Neuron, v.19, n.2, p.219-21. 1997.

NICOLELIS, M. A. L. e RIBEIRO, S. Multielectrode recordings: the next steps. Current Opinion in Neurobiology, v.12, n.5, p.602-6. 2002.

NISHIKAWA, K. e MACIVER, M. B. Membrane and synaptic actions of halothane on rat hippocampal pyramidal neurons and inhibitory interneurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.20, n.16, p.5915-23. 2000.

NUNEZ, A., GARCIAUSTT, E. e BUNO, W. INTRACELLULAR THETA-RHYTHM GENERATION IN IDENTIFIED HIPPOCAMPAL PYRAMIDS. Brain Research, v.416, n.2, Jan 1, p.289-300. 1987.

O'KEEFE, J. Do hippocampal pyramidal cells signal non-spatial as well as spatial information? Hippocampus, v.9, n.4, p.352-64. 1999.

O'KEEFE, J. e BURGESS, N. Dual phase and rate coding in hippocampal place cells: theoretical significance and relationship to entorhinal grid cells. Hippocampus, v.15, n.7, p.853-66. 2005.

O'MARA, S. M., COMMINS, S., ANDERSON, M. e GIGG, J. The subiculum: a review of form, physiology and function. Progress in Neurobiology, v.64, n.2, p.129-55. 2001.

OCHIISHI, T., SAITOH, Y., YUKAWA, A., SAJI, M., REN, Y., SHIRAO, T., MIYAMOTO, H., NAKATA, H. e SEKINO, Y. High level of adenosine A1 receptor-like immunoreactivity in the CA2/CA3a region of the adult rat hippocampus. Neuroscience, v.93, n.3, p.955-67. 1999.

PAN, W. e MCNAUGHTON, N. The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. Progress in Neurobiology, v.74, n.3, p.127-166. 2004.

PAUL, S., NAIRN, A. C., WANG, P. e LOMBROSO, P. J. NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling. Nature Neuroscience, v.6, n.1, p.34-42. 2003.

PAVLIDES, C., GREENSTEIN, Y. J., GRUDMAN, M. e WINSON, J. Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of theta-rhythm. Brain Research, v.439, n.1-2, p.383-7. 1988.

PAXINOS, G. e WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2007. 456 p.

PEIGNEUX, P., LAUREYS, S., DELBEUCK, X. e MAQUET, P. Sleeping brain, learning brain. The role of sleep for memory systems. Neuroreport, v.12, n.18, Dec 21, p.A111-24. 2001.

PELKEY, K. A., ASKALAN, R., PAUL, S., KALIA, L. V., NGUYEN, T. H., PITCHER, G. M., SALTER, M. W. e LOMBROSO, P. J. Tyrosine phosphatase STEP is a tonic brake on induction of long-term potentiation. Neuron, v.34, n.1, p.127-38. 2002.

PENFIELD, W. e MILNER, B. Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. Arch Neurol Psychiatry, v.79, n.5, p.475-497. 1958.

PEREIRA, A., RIBEIRO, S., WIEST, M. C., MOORE, L. C., PANTOJA, J., LIN, S. e NICOLELIS, M. A. L. Processing of tactile information by the hippocampus. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.104, n.46, p.18286-91. 2007.

PETSCHKE, H., STUMPF, C. e GOGOLAK, G. [The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells.]. Electroencephalography and clinical neurophysiology, v.14, p.202-11. 1962.

PINKSTAFF, J. K., DETTERICH, J., LYNCH, G. e GALL, C. M. Integrin Subunit Gene Expression Is Regionally Differentiated in Adult Brain. Journal of Neuroscience. 1999.

PIZZORUSSO, T., MEDINI, P., BERARDI, N., CHIERZI, S., FAWCETT, J. W. e MAFFEI, L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. Science, v.298, n.5596, p.1248-51. 2002.

POE, G. R., NITZ, D. A., MCNAUGHTON, B. L. e BARNES, C. A. Experience-dependent phase-reversal of hippocampal neuron firing during REM sleep. Brain Research, v.855, n.1, p.176-80. 2000.

QUIAN QUIROGA, R., NADASDY, Z. e BEN-SHAUL, Y. Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. Neural computation, v.16, n.8, p.1661-87. 2004.

QUIAN QUIROGA, R., REDDY, A., KREIMAN, G., KOCH, C. e FRIED, I. Invariant visual representation by single neurons in the human brain. Nature, v.435, n.7045, p.1102-7. 2005.

RAMÓN Y CAJAL, S. Histologie du system nerveux de l'homme & des vertebres, Äé. 1909.

RANCK, J. B. Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. Experimental Neurology, v.41, n.2, p.461-531. 1973.

REDISH, A. D. The hippocampal debate: are we asking the right questions? Behavioural Brain Research, v.127, n.1-2, p.81-98. 2001.

RIBEIRO, S., GERVASONI, D., SOARES, E., ZHOU, Y., LIN, S., PANTOJA, J., LAVINE, M. e NICOLELIS, M. A. L. Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas. PLoS Biology, v.2, n.1, p.E24. 2004.

RIBEIRO, S., MELLO, C. V., VELHO, T., GARDNER, T. J., JARVIS, E. D. e PAVLIDES, C. Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. Journal of Neuroscience, v.22, n.24, p.10914-23. 2002.

RIBEIRO, S. e NICOLELIS, M. A. L. Reverberation, storage, and postsynaptic propagation of memories during sleep. Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY), v.11, n.6, p.686-96. 2004.

RISOLD, P. Y. e SWANSON, L. W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. Science, v.272, n.5267, p.1484-6. 1996.

RISOLD, P. Y. e SWANSON, L. W. Connections of the rat lateral septal complex. Brain research Brain research reviews, v.24, n.2-3, p.115-95. 1997.

RISOLD, P. Y., THOMPSON, R. H. e SWANSON, L. W. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. Brain research Brain research reviews, v.24, n.2-3, p.197-254. 1997.

ROLLS, E. T. An attractor network in the hippocampus: theory and neurophysiology. Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY), v.14, n.11, p.714-31. 2007.

SABOLEK, H. R., PENLEY, S. C., HINMAN, J. R., BUNCE, J. G., MARKUS, E. J., ESCABI, M. e CHROBAK, J. J. Theta and gamma coherence along the septotemporal axis of the hippocampus. Journal of Neurophysiology, v.101, n.3, p.1192-200. 2009.

SCCN. EEGLab <http://scn.ucsd.edu/eeglab/>. 2008.

SCHENBERG, E. E. e OLIVEIRA, M. G. M. Effects of pre or posttraining dorsal hippocampus D-AP5 injection on fear conditioning to tone, background, and foreground context. Hippocampus, v.18, n.11, p.1089-1093. 2008.

SCHENBERG, E. E., SOARES, J. C. e OLIVEIRA, M. G. M. Effects of pre- or post-training entorhinal cortex AP5 injection on fear conditioning. Physiology & Behavior, v.86, n.4, p.508-15. 2005.

SCHINDER, A. e GAGE, F. H. A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. Physiology (Bethesda, Md), v.19, p.253-61. 2004.

SCORZA, F. A., ARIDA, R. M., NAFFAH-MAZZACORATTI, M. D. G., SCERNI, D. A., CALDERAZZO, L. e CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? An Acad Bras Cienc, v.81, n.3, Sep 1, p.345-65. 2009.

SCOVILLE, W. B. e MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, v.20, n.1, p.11-21. 1957.

SEKINO, Y., OBATA, K., TANIFUJI, M., MIZUNO, M. e MURAYAMA, J. Delayed signal propagation via CA2 in rat hippocampal slices revealed by optical recording. Journal of Neurophysiology, v.78, n.3, p.1662-8. 1997.

SHIRVALKAR, P. R. Hippocampal neural assemblies and conscious remembering. Journal of Neurophysiology, v.101, n.5, p.2197-200. 2009.

SHIRVALKAR, P. R. e BAHAR, A. S. The multiple origins and laminar topography of the hippocampal theta rhythm. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.29, n.22, p.7111-3. 2009.

SIMONS, S. B., ESCOBEDO, Y., YASUDA, R. e DUDEK, S. M. Regional differences in hippocampal calcium handling provide a cellular mechanism for limiting plasticity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009.

SINGER, W. Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. Annual review of physiology, v.55, p.349-74. 1993.

SLOVITER, R. S. A simplified Timm stain procedure compatible with formaldehyde fixation and routine paraffin embedding of rat brain. Brain Research Bulletin, v.8, n.6, p.771-4. 1982.

SMITH, C. e LAPP, L. Increases in number of REMS and REM density in humans following an intensive learning period. Sleep, v.14, n.4, Aug, p.325-30. 1991.

SOMOGYI, P. e KLAUSBERGER, T. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. The Journal of Physiology, v.562, n.Pt 1, p.9-26. 2005.

SQUIRE, L. R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. Neurobiology of Learning and Memory, v.82, n.3, p.171-177. 2004.

SQUIRE, L. R. e BAYLEY, P. The neuroscience of remote memory. Current Opinion in Neurobiology, v.17, n.2, p.185-196. 2007.

SQUIRE, L. R. e CAVE, C. B. The hippocampus, memory, and space. Hippocampus, v.1, n.3, p.269-71. 1991.

SQUIRE, L. R., STARK, C. E. e CLARK, R. The medial temporal lobe. Annual Review of Neuroscience, v.27, p.279-306. 2004.

STENBERG, D. Neuroanatomy and neurochemistry of sleep. Cell Mol Life Sci, v.64, n.10, May 1, p.1187-204. 2007.

STERIADE, M. Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. Neuroscience, v.137, n.4, p.1087-106. 2006.

STEWART, O. TOPOGRAPHIC ORGANIZATION OF PROJECTIONS FROM ENTORHINAL AREA TO HIPPOCAMPAL FORMATION OF RAT. Journal Of Comparative Neurology, v.167, n.3, p.285-314. 1976.

STICKGOLD, R. Sleep-dependent memory consolidation. Nature, v.437, n.7063, p.1272-8. 2005.

STICKGOLD, R. Neuroscience: a memory boost while you sleep. Nature, v.444, n.7119, p.559-60. 2006.

STICKGOLD, R., HOBSON, J. A., FOSSE, R. e FOSSE, M. Sleep, learning, and dreams: off-line memory reprocessing. Science, v.294, n.5544, Nov 2, p.1052-7. 2001.

STUMPF, C., PETSCHKE, H. e GOGOLAK, G. The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. II. The differential influence of drugs upon both the septal cell firing pattern and the hippocampus theta activity. Electroencephalography and clinical neurophysiology, v.14, p.212-9. 1962.

SWANSON, L. W., WYSS, J. M. e COWAN, W. M. An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. The Journal of Comparative Neurology, v.181, n.4, p.681-715. 1978.

TÓTH, K. e FREUND, T. F. Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. Neuroscience, v.49, n.4, p.793-805. 1992.

TAKAHASHI, R. N., PAMPLONA, F. A. e PREDIGER, R. D. S. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. Front Biosci, v.13, Jan 1, p.2614-32. 2008.

TAMAMAKI, N., ABE, K. e NOJYO, Y. Three-dimensional analysis of the whole axonal arbors originating from single CA2 pyramidal neurons in the rat hippocampus with the aid of a computer graphic technique. Brain Research, v.452, n.1-2, p.255-72. 1988.

TANILA, H. Hippocampal place cells can develop distinct representations of two visually identical environments. Hippocampus, v.9, n.3, p.235-46. 1999.

TIMO-IARIA, C., NEGRÃO, N., SCHMIDEK, W. R., HOSHINO, K., LOBATO DE MENEZES, C. E. e LEME DA ROCHA, T. Phases and states of sleep in the rat. Physiology & Behavior, v.5, n.9, p.1057-62. 1970.

TONG, G., MALENKA, R. C. e NICOLL, R. A. Long-term potentiation in cultures of single hippocampal granule cells: a presynaptic form of plasticity. Neuron, v.16, n.6, p.1147-57. 1996.

TONONI, G. e CIRELLI, C. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. Brain Research Bulletin, v.62, n.2, p.143-50. 2003.

TONONI, G. e CIRELLI, C. Sleep function and synaptic homeostasis. Sleep Medicine Reviews, v.10, n.1, p.49-62. 2006.

TONONI, G., MASSIMINI, M. e RIEDNER, B. Sleepy Dialogues between Cortex and Hippocampus: Who Talks to Whom? Neuron, v.52, n.5, p.748-749. 2006.

TROPP SNEIDER, J., CHROBAK, J. J., QUIRK, M. C., OLER, J. A. e MARKUS, E. J. Differential behavioral state-dependence in the burst properties of CA3 and CA1 neurons. Neuroscience, v.141, n.4, p.1665-77. 2006.

UCSD. Project H.M. 2010.

URBAN, N. N., HENZE, D. A. e BARRIONUEVO, G. Revisiting the role of the hippocampal mossy fiber synapse. Hippocampus, v.11, n.4, p.408-17. 2001.

VAN STRIEN, N. M., CAPPAERT, N. L. e WITTER, M. P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. Nature Reviews Neuroscience, v.10, n.4, p.272-82. 2009.

VANDERWOLF, C. CEREBRAL-ACTIVITY AND BEHAVIOR - CONTROL BY CENTRAL CHOLINERGIC AND SEROTONERGIC SYSTEMS. Int Rev Neurobiol, v.30, Jan 1, p.225-340. 1988.

VANDERWOLF, C. H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. Electroencephalography and clinical neurophysiology, v.26, n.4, p.407-18. 1969.

VERTES, R. P. Brainstem afferents to the basal forebrain in the rat. Neuroscience, v.24, n.3, p.907-35. 1988.

VERTES, R. P. e MCKENNA, J. T. Collateral projections from the supramammillary nucleus to the medial septum and hippocampus. Synapse (New York, NY), v.38, n.3, p.281-93. 2000.

VINCENT, S. e MCGEER, E. A SUBSTANCE-P PROJECTION TO THE HIPPOCAMPUS. Brain Research, v.215, n.1-2, Jan 1, p.349-351. 1981.

VINCENT, S. R., SATOH, K., ARMSTRONG, D. M. e FIBIGER, H. C. Substance P in the ascending cholinergic reticular system. Nature, v.306, n.5944, Jan 1, p.688-91. 1983.

VINOGRADOVA, O. S. Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. Progress in Neurobiology, v.45, n.6, p.523-83. 1995.

VINOGRADOVA, O. S. Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. Hippocampus, v.11, n.5, p.578-98. 2001.

WUHRL, R., VON HAEBLER, D. e HEINEMANN, U. Low-frequency stimulation of the direct cortical input to area CA1 induces homosynaptic LTD and heterosynaptic LTP in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. European Journal of Neuroscience, v.25, n.1, p.251-8. 2007.

WALKER, M. P. A refined model of sleep and the time course of memory formation. Behav Brain Sci, v.28, n.1, Feb, p.51-64; discussion 64-104. 2005.

WALKER, M. P. e STICKGOLD, R. Sleep, Memory, and Plasticity. Annual Review of Psychology, v.57, n.1, p.139-166. 2006.

WHITLOCK, J. R., HEYNEN, A. J., SHULER, M. G. e BEAR, M. F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. Science, v.313, n.5790, p.1093-7. 2006.

WILSON, M. A. e MCNAUGHTON, B. L. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. Science, v.265, n.5172, p.676-9. 1994.

WITTER, M. P., NABER, P. A., VAN HAEFTEN, T., MACHIELSEN, W. C., ROMBOUTS, S. A., BARKHOF, F., SCHELTENS, P. e LOPES DA SILVA, F. H. Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. Hippocampus, v.10, n.4, p.398-410. 2000.

WOODHAMS, P. L., CELIO, M. R., ULFIG, N. e WITTER, M. P. Morphological and functional correlates of borders in the entorhinal cortex and hippocampus. Hippocampus, v.3 Spec No, p.303-11. 1993.

WYSS, J. M., SWANSON, L. W. e COWAN, W. M. Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus. Anatomy and embryology, v.156, n.2, p.165-76. 1979.

YAMAMOTO, M., MARSHALL, P., HEMMENDINGER, L. M., BOYER, A. B. e CAVINESS, V. S. Distribution of glucuronic acid-and-sulfate-containing glycoproteins in the central nervous system of the adult mouse. Neuroscience Research, v.5, n.4, p.273-98. 1988.

YECKEL, M. F. e BERGER, T. W. Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.87, n.15, p.5832-6. 1990.

YLINEN, A., BRAGIN, A., NADASDY, Z., JANDOS, G., SZABO, I., SIK, A. e BUZSAKI, G. Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.15, n.1 Pt 1, p.30-46. 1995.

ZHAO, M., CHOI, Y. S., OBRIETAN, K. e DUDEK, S. M. Synaptic plasticity (and the lack thereof) in hippocampal CA2 neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.27, n.44, p.12025-32. 2007.

ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L. R. e AMARAL, D. G. Lesions of the hippocampal formation but not lesions of the fornix or the mammillary nuclei produce long-lasting memory impairment in monkeys. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v.9, n.3, p.898-913. 1989.

8. Apêndices

8.1. Apêndice A – Perdas devido a ruído e problemas em canais

Animal	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
ES57	-	3	3,25	3, 25	3, 17, 25
ES59	53, 57, 58	53, 57, 58, 62	53, 57, 58, 62	53, 57, 58, 62	53, 57, 58, 62
ES60	-	-	-	52	49, 52

Tabela 1 – Número dos canais com problemas, para cada rato e cada dia de registro. Canais com problemas em qualquer dia foram excluídos de todas as análises posteriores.

ES57	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
Dia 1	4,80 (1,02)	3,71 (0,51)	3,79 (2,14)	0	0	0,41 (0,03)
Dia 2	39,80 (6,44)	4,19 (1,23)	37,82 (4,42)	0	0	0
Dia 3	8,74 (4,39)	2,22 (0,24)	6,84 (2,72)	0	0	0
Dia 4	69,89 (12,80)	0	8,66 (2,71)	0	0	0
Dia 5	99,08 (7,17)	7,27 (1,05)	30,95 (3,23)	0	0	0

Tabela 2 – Tempo de registro de cada estágio que foi perdido devido a ruídos (segundos (% do estágio)), no animal ES57.

ES59	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
Dia 1	248,52 (62,28)	78,90 (13,00)	180,55 (33,56)	2,28 (0,56)	0	3,41 (0,22)
Dia 2	175,69 (45,63)	211,56 (17,88)	228,80 (46,13)	18,95 (4,15)	14,10 (0,42)	28,95 (2,41)
Dia 3	213,44 (62,78)	398,40 (31,49)	339,04 (51,60)	27,10 (6,74)	23,57 (0,65)	2,25 (0,26)
Dia 4	250,05 (70,04)	105,32 (21,58)	409,40 (46,11)	18,32 (4,34)	19,68 (0,52)	22,31 (2,16)
Dia 5	111,70 (82,13)	130,73 (24,48)	414,82 (59,51)	40,52 (13,20)	140,87 (3,49)	70,79 (4,77)

Tabela 3 – Tempo de registro de cada estágio que foi perdido devido a ruídos (segundos (% do estágio)), no animal ES59.

ES60	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
Dia 1	-	-	-	-	-	-
Dia 2	138,04 (25,56)	173,03 (35,53)	152,07 (33,50)	67,23 (8,84)	212,68 (5,94)	28,32 (2,07)
Dia 3	111,95 (46,07)	130,95 (32,66)	137,10 (25,21)	44,86 (8,11)	32,25 (0,80)	36,54 (2,68)
Dia 4	67,65 (24,87)	92,17 (18,28)	147,90 (29,64)	30,97 (5,70)	37,54 (0,94)	39,48 (2,86)
Dia 5	197,35 (56,23)	311,07 (39,23)	217,64 (36,21)	95,12 (20,15)	182,75 (4,93)	39,12 (3,13)

Tabela 4 – Tempo de registro de cada estágio que foi perdido devido a ruídos (segundos (% do estágio)), no animal ES60.

8.2. Apêndice B – Duração dos Estágios

ES57	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
Dia 1	472 (6,6)	718 (10,0)	177 (2,5)	829 (11,5)	3723 (51,7)	1281 (17,8)
Dia 2	618 (8,6)	342 (4,8)	856 (11,9)	465 (6,5)	3749 (52,1)	1170 (16,3)
Dia 3	199 (2,8)	931 (12,9)	251 (3,5)	312 (4,3)	4757 (66,1)	750 (10,4)
Dia 4	546 (7,6)	454 (6,3)	320 (4,4)	426 (5,9)	4692 (65,2)	762 (10,6)
Dia 5	1382 (19,2)	695 (9,7)	957 (13,3)	524 (7,3)	3240 (45,0)	402 (5,6)

Tabela 1 – Duração dos estágios do ciclo sono-vigília (segundos (%)) para os cinco dias de registro do animal ES57. VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

ES59	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
Dia 1	399 (5,5)	607 (8,4)	538 (7,5)	410 (5,7)	3703 (51,4)	1534 (21,3)
Dia 2	385 (5,3)	1183 (16,4)	496 (6,9)	456 (6,3)	3341 (46,4)	1202 (16,7)
Dia 3	340 (4,7)	1266 (17,6)	657 (9,1)	402 (5,6)	3647 (50,7)	858 (11,9)
Dia 4	357 (5,0)	488 (6,8)	888 (12,3)	422 (5,9)	3783 (52,5)	1034 (14,4)
Dia 5	136 (1,9)	534 (7,4)	697 (9,7)	307 (4,3)	4038 (56,1)	1484 (20,6)

Tabela 2 - Duração dos estágios do ciclo sono-vigília (segundos (%)) para os cinco dias de registro do animal ES59. VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

ES60	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
Dia 1	-	-	-	-	-	-
Dia 2	540 (7,5)	487 (6,8)	454 (6,3)	761 (10,6)	3578 (49,7)	1371 (19,0)
Dia 3	243 (3,4)	401 (5,6)	544 (7,6)	553 (7,7)	4066 (56,5)	1363 (18,9)
Dia 4	272 (3,8)	504 (7,0)	499 (6,9)	543 (7,5)	3985 (55,3)	1379 (19,2)
Dia 5	351 (4,9)	793 (11,0)	601 (8,3)	472 (6,6)	3707 (51,5)	1248 (17,3)

Tabela 3 - Duração dos estágios do ciclo sono-vigília (segundos (%)) para os cinco dias de registro do animal ES60. Devido à problema na memória RAM do computador de registro, um trecho do dia 1 deste animal foi perdido, impossibilitando a sincronização entre o vídeo e o sinal e portanto impedindo o estagiamento do ciclo. VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

8.3. Apêndice C – Número de janelas de 10 s por estágio

ES57	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
T1	67	6	42	0	9	0
T2	2	3	0	5	127	11
T3	12	2	11	12	65	10
T4	10	11	18	3	85	14

Tabela 1 – Número de janelas de 10 s de cada estágio em cada trecho de 30 min (T1 a T4) do último dia de registro do animal ES57. VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

ES59	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
T1	0	13	21	2	56	0
T2	0	3	0	1	100	38
T3	0	1	0	1	94	52
T4	0	0	0	2	101	39

Tabela 2 – Número de janelas de 10 s de cada estágio em cada trecho de 30 min (T1 a T4) do último dia de registro do animal ES59. VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

ES60	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
T1	7	10	29	1	46	0
T2	0	9	0	2	101	18
T3	0	0	0	1	73	41
T4	0	0	0	4	87	45

Tabela 3 – Número de janelas de 10 s de cada estágio em cada trecho de 30 min (T1 a T4) do último dia de registro do animal ES60. VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

8.4. Apêndice D – Valores de disparos multiunitários

Taxa de disparo	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
CA1	1,32 ± 0,19	0,85 ± 0,11	1,23 ± 0,16	0,76 ± 0,11	0,50 ± 0,09	0,59 ± 0,08
CA2	1,16 ± 0,38	0,85 ± 0,22	1,10 ± 0,31	0,56 ± 0,21	0,38 ± 0,17	0,49 ± 0,15
CA3	0,78 ± 0,14	0,47 ± 0,08	0,57 ± 0,11	0,50 ± 0,08	0,43 ± 0,06	0,25 ± 0,06

Tabela 1 - Taxa de disparo (média +- e.p., em Hz) de cada região ao longo do ciclo sono-vigília (média +- e.p.). VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

Intervalo entre disparos	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
CA1	0,18 ± 0,05	0,30 ± 0,06	0,22 ± 0,05	0,19 ± 0,04	0,29 ± 0,06	0,20 ± 0,04
CA2	0,09 ± 0,10	0,22 ± 0,13	0,16 ± 0,11	0,20 ± 0,08	0,66 ± 0,12	0,04 ± 0,04
CA3	0,04 ± 0,04	0,08 ± 0,05	0,05 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,05	0,13 ± 0,03

Tabela 2 – Intervalo entre disparos (média +- e.p., em segundos) de cada região ao longo do ciclo sono-vigília (média +- e.p.). VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

Salvas/ Disparos simples	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
CA1	0,004 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,008 ± 0,002	0,005 ± 0,002	0,008 ± 0,012	0,001 ± 0,001
CA2	0,007 ± 0,003	0,004 ± 0,003	0,012 ± 0,003	0,004 ± 0,003	0,017 ± 0,024	0,002 ± 0,002
CA3	0,008 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,066 ± 0,001	0,005 ± 0,001

Tabela 3 – Salvas/disparos simples (média +- e.p.) de cada região ao longo do ciclo sono-vigília (média +- e.p.). VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

Disparos por salva	VA	VQ	AL	Son	SOL	REM
CA1	2,10 ± 0,03	2,06 ± 0,03	2,08 ± 0,03	2,11 ± 0,04	2,09 ± 0,03	2,02 ± 0,27
CA2	2,07 ± 0,06	2,13 ± 0,05	2,08 ± 0,05	2,16 ± 0,07	2,15 ± 0,05	2,05 ± 0,05
CA3	2,11 ± 0,02	2,13 ± 0,02	2,13 ± 0,02	2,19 ± 0,03	2,20 ± 0,02	2,13 ± 0,02

Tabela 4 – Número de disparos por salva em cada região durante o ciclo sono-vigília (média +- e.p.). VA = Vigília Ativa, VQ = Vigília Quieta, AL = Autolimpeza, Son = Sonolência, SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

8.5. Apêndice E – Resultados da estatística da coerência

ES57	Teta (direito)		Gama Lento [§] (direito)		Gama Rápido (direito)	
	Interação (WL n=74)	$F_{(2,71)}$ 31,243	$p < 0,001$	$F_{(2,71)}$ 2,461	$p = 0,093$	$F_{(2,71)}$ 16,974
ANOVA SOL (n=64)	$F_{(2,62)}$ 3147,0	$p < 0,01\#$	Efeito Grupo	$p < 0,001$	$F_{(2,62)}$ 2389,0	$p < 0,01\#$
CA1-2 x CA1-3		$p < 0,001$		$p < 0,001$		$p < 0,001$
CA1-2 x CA2-3		$p < 0,001$		$p < 0,001$		$p < 0,001$
CA1-3 x CA2-3		$p < 0,001$		$p < 0,001$		$p < 0,001$
ANOVA REM (n=10)	$F_{(2,8)}$ 72,183	$p < 0,01\#$	Efeito Estágio	$p = 0,478$	$F_{(2,8)}$ 674,0	$p < 0,01\#$
CA1-2 x CA1-3		$p < 0,001$		-		$p < 0,001$
CA1-2 x CA2-3		$p < 0,001$		-		$p < 0,001$
CA1-3 x CA2-3		$p < 0,001$		-		$p = 0,004$

Tabela 1 – Valores de F e p da análise estatística com ANOVA de duas vias com medidas repetidas para a coerência em dois estágios (SOL e sono REM) em três áreas (medidas repetidas). Para cada banda de frequência foram realizadas análises separadamente. O nível de significância adotado foi sempre de $p < 0,05$, mas os valores mostrados são sempre o mais preciso possível, conforme fornecido pelo programa SPSS. As análises estatísticas foram realizadas somente ipsilateralmente. Em letras pretas, à esquerda, os resultados do hemisfério esquerdo. Em branco, à direita, os resultados do hemisfério direito. A banda teta aparece em cinza escuro, o gama lento em cinza intermediário e o gama rápido em cinza claro. §Apenas para a banda gama lento o resultado da interação não foi significativo, portanto foram utilizados apenas os efeitos principais (estágio e áreas) da análise inicial. # representa p valores corrigidos pela técnica de Bonferroni, i.e., multiplicados por dois, dado que após a interação significativa (avaliada pelo valor de Lambda de Wilk, WL) foram realizadas duas ANOVAs, uma para cada estágio. As comparações aos pares (CA1-2 x CA1-3, CA1-2 x CA2-3, CA1-3 x CA2-3) foram realizadas com teste a posteriori de bonferroni. SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

Apêndice E – continuação

ES57	CA1-3 (esquerdo)		CA1-2 ³ (direito)		CA1-3 (direito)		CA2-3 (direito)	
	$F_{(2,71)}$ 22,570	$p < 0,001$	$F_{(2,71)}$ 0,491	$p = 0,614$	$F_{(2,71)}$ 70,958	$p < 0,001$	$F_{(2,71)}$ 61,677	$p < 0,001$
Interação (WL n=74)	$F_{(2,62)}$ 538,1	$p < 0,01\#$	<i>Efeito Banda</i>	$p < 0,001$	$F_{(2,62)}$ 31,541	$p < 0,01\#$	$F_{(2,62)}$ 267,7	$p < 0,01\#$
Teta x Gama Lento		$p < 0,001$		$p < 0,001$		$p < 0,001$		$p = 0,013$
Teta x Gama Rápido		$p < 0,001$		$p < 0,001$		$p < 0,001$		$p < 0,001$
Gama Lento x Gama Rápido		$p < 0,001$		$p < 0,001$		$p < 0,001$		$p < 0,001$
ANOVA REM (n=10)	$F_{(2,8)}$ 89,779	$p < 0,01\#$	<i>Efeito Estágio</i>	$p < 0,001$	$F_{(2,8)}$ 17,641	$p = 0,002\#$	$F_{(2,8)}$ 103,4	$p < 0,01\#$
Teta x Gama Lento		$p < 0,001$		-		$p = 0,002$		$p < 0,001$
Teta x Gama Rápido		$p < 0,001$		-		$p = 0,001$		$p < 0,001$
Gama Lento x Gama Rápido		$p < 0,001$		-		$p = 0,007$		$p < 0,001$

Tabela 2 – Valores de F e p da análise estatística com ANOVA de duas vias com medidas repetidas para a coerência em dois estágios (SOL e sono REM) em três bandas (medidas repetidas). Para cada par de áreas foram realizadas análises separadamente. O nível de significância adotado foi sempre de $p < 0,05$, mas os valores mostrados são sempre o mais preciso possível, conforme fornecido pelo programa SPSS. As análises estatísticas foram realizadas somente ipsilateralmente. Em letras pretas, à esquerda, os resultados do hemisfério esquerdo. Em branco, à direita, os resultados do hemisfério direito. A coerência entre CA1-CA2 aparece em cinza escuro, entre CA1-CA3 em cinza intermediário e entre CA2-CA3 em cinza claro. \$ Apenas para o par CA1-CA2 direito que o resultado da interação não foi significativo, portanto foram utilizados apenas os efeitos principais (estágio e bandas) da análise inicial. # representa p valores corrigidos pela técnica de Bonferroni, i.e., multiplicados por dois, dado que após a interação significativa (avaliada pelo valor de Lambda de Wilk, WL) foram realizadas duas ANOVAs, uma para cada estágio. As comparações aos pares (CA1-2 x CA1-3, CA1-2 x CA2-3, CA1-3 x CA2-3) foram realizadas com teste a posteriori de bonferroni. SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

Apêndice E – continuação

ES59	Teta (esquerdo)		Gama Lento (esquerdo)		Gama Rápido (esquerdo)		Teta (direito)		Gama Lento (direito)		Gama Rápido (direito)	
	$F_{(2,142)}$ 264,917	$p<0,001$	$F_{(2,142)}$ 170,772	$p<0,001$	$F_{(2,142)}$ 20,004	$p<0,001$	$F_{(2,142)}$ 157,3	$p<0,001$	$F_{(2,142)}$ 33,888	$p<0,001$	$F_{(2,142)}$ 12,676	$p<0,001$
Interação (WL n=145)	$F_{(2,91)}$ 6966,0	$p<0,01\#$	$F_{(2,91)}$ 1055,0	$p<0,01\#$	$F_{(2,91)}$ 933,5	$p<0,01\#$	$F_{(2,91)}$ 493,4	$p<0,01\#$	$F_{(2,91)}$ 794,5	$p<0,01\#$	$F_{(2,91)}$ 3865,0	$p<0,01\#$
ANOVA SOL (n=93)		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$
CA1-2 x CA1-3		$p<0,001$		$p=0,028$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$
CA1-2 x CA2-3		$p=0,002$		$p=1,000$		$p<0,001$		$p=1,000$		$p<0,001$		$p<0,001$
CA1-3 x CA2-3	$F_{(2,50)}$ 361,2	$p<0,01\#$	$F_{(2,50)}$ 6662,0	$p<0,01\#$	$F_{(2,50)}$ 609,2	$p<0,01\#$	$F_{(2,50)}$ 396,4	$p<0,01\#$	$F_{(2,50)}$ 316,4	$p<0,01\#$	$F_{(2,50)}$ 3526,0	$p<0,01\#$
ANOVA REM (n=52)		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p=0,051$		$p<0,001$		$p<0,001$
CA1-2 x CA1-3		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$
CA1-2 x CA2-3		$p=1,000$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p=0,009$		$p<0,001$
CA1-3 x CA2-3		$p=1,000$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$		$p<0,001$

Tabela 3 – Valores de F e p da análise estatística com ANOVA de duas vias com medidas repetidas para a coerência em dois estágios (SOL e sono REM) em três áreas (medidas repetidas). Para cada banda de frequência foram realizadas análises separadamente. O nível de significância adotado foi sempre de $p < 0,05$, mas os valores mostrados são sempre o mais preciso possível, conforme fornecido pelo programa SPSS. As análises estatísticas foram realizadas somente ipsilateralmente. Em letras pretas, à esquerda, os resultados do hemisfério esquerdo. Em branco, à direita, os resultados do hemisfério direito. A banda teta aparece em cinza escuro, o gama lento em cinza intermediário e o gama rápido em cinza claro. # representa p valores corrigidos pela técnica de Bonferroni, i.e., multiplicados por dois, dado que após a interação significativa (avaliada pelo valor de Lambda de Wilk, WL) foram realizadas duas ANOVAs, uma para cada estágio. As comparações aos pares (CA1-2 x CA1-3, CA1-2 x CA2-3, CA1-3 x CA2-3) foram realizadas com teste a posteriori de Bonferroni. SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

Apêndice E – continuação

ES59	CA1-2 (esquerdo)		CA1-3 (esquerdo)		CA2-3 (esquerdo)		CA1-2 (direito)		CA1-3 (direito)		CA2-3 (direito)	
	$F_{(2,142)}$ 238,3	p<0,001	$F_{(2,142)}$ 89,090	p<0,001	$F_{(2,142)}$ 150,6	p<0,001	$F_{(2,142)}$ 202,7	p<0,001	$F_{(2,142)}$ 349,575	p<0,001	$F_{(2,142)}$ 148,3	p<0,001
Interação (WL, n=145)												
ANOVA SOL (n=93)	$F_{(2,91)}$ 1197,0	p<0,01#	$F_{(2,91)}$ 110,2	p<0,01#	$F_{(2,91)}$ 298,9	p<0,01#	$F_{(2,91)}$ 312,0	p<0,01#	$F_{(2,91)}$ 196,2	p<0,01#	$F_{(2,91)}$ 392,4	p<0,01#
Tela x Gama Lento		p<0,001		p<0,001		p=1,000		p<0,001		p<0,001		p<0,001
Tela x Gama Rápido		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p=1,000		p<0,001		p<0,001
Gama Lento x Gama Rápido		p<0,001		p<0,001		p=0,930		p<0,001		p<0,001		p<0,001
ANOVA REM (n=52)	$F_{(2,50)}$ 2732,0	p<0,01#	$F_{(2,50)}$ 338,4	p<0,01#	$F_{(2,50)}$ 458,5	p<0,01#	$F_{(2,50)}$ 671,1	p<0,01#	$F_{(2,50)}$ 656,4	p<0,01#	$F_{(2,50)}$ 465,1	p<0,01#
Tela x Gama Lento		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001
Tela x Gama Rápido		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001
Gama Lento x Gama Rápido		p<0,001		p<0,001		p=0,037		p<0,001		p<0,001		p<0,001

Tabela 4 - Valores de F e p da análise estatística com ANOVA de duas vias com medidas repetidas para a coerência em dois estágios (SOL e sono REM) em três bandas (medidas repetidas). Para cada par de áreas foram realizadas análises separadamente. O nível de significância adotado foi sempre de $p < 0,05$, mas os valores mostrados são sempre o mais preciso possível, conforme fornecido pelo programa SPSS. As análises estatísticas foram realizadas somente ipsilateralmente. Em letras pretas, à esquerda, os resultados do hemisfério esquerdo. Em branco, à direita, os resultados do hemisfério direito. A coerência entre CA1-CA2 aparece em cinza escuro, entre CA1-CA3 em cinza intermediário e entre CA2-CA3 em cinza claro. # representa p valores corrigidos pela técnica de Bonferroni, i.e., multiplicados por dois, dado que após a interação significativa (avaliada pelo valor de Lambda de Wilk, WL) foram realizadas duas ANOVAs, uma para cada estágio. As comparações aos pares (CA1-2 x CA1-3, CA1-2 x CA2-3, CA1-3 x CA2-3) foram realizadas com teste a posteriori de Bonferroni. SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

Apêndice E – continuação

ES60	Teta (esquerdo)		Gama Lento (esquerdo)		Gama Rápido (esquerdo)		Teta (direito)		Gama Lento (direito)		Gama Rápido (direito)	
	$F_{(2,111)}$	p	$F_{(2,111)}$	p	$F_{(2,111)}$	p	$F_{(2,111)}$	p	$F_{(2,111)}$	p	$F_{(2,111)}$	p
Interação (WL n=114)	171,2	p<0,001	96,252	p<0,001	55,496	p<0,001	182,1	p<0,001	53,946	p<0,001	43,379	p<0,001
ANOVA SOL (n=73)	3434,0	p<0,01#	3333,0	p<0,01#	7515,0	p<0,01#	4199,0	p<0,01#	696,6	p<0,01#	1259,0	p<0,01#
CA1-2 x CA1-3		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001
CA1-2 x CA2-3		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001
CA1-3 x CA2-3		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001
ANOVA REM (n=41)	122,2	p<0,01#	1301,0	p<0,01#	3679,0	p<0,01#	272,2	p<0,01#	2245,0	p<0,01#	4260,0	p<0,01#
CA1-2 x CA1-3		p=0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001
CA1-2 x CA2-3		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001
CA1-3 x CA2-3		p=0,005		p<0,001		p<0,001		p=0,346		p<0,001		p<0,001

Tabela 5 – Valores de F e p da análise estatística com ANOVA de duas vias com medidas repetidas para a coerência em dois estágios (SOL e sono REM) em três áreas (medidas repetidas). Para cada banda de frequência foram realizadas análises separadamente. O nível de significância adotado foi sempre de $p < 0,05$, mas os valores mostrados são sempre o mais preciso possível, conforme fornecido pelo programa SPSS. As análises estatísticas foram realizadas somente ipsilateralmente. Em letras pretas, à esquerda, os resultados do hemisfério esquerdo. Em branco, à direita, os resultados do hemisfério direito. A banda teta aparece em cinza escuro, o gama lento em cinza intermediário e o gama rápido em cinza claro. # representa p valores corrigidos pela técnica de Bonferroni, i.e., multiplicados por dois, dado que após a interação significativa (avaliada pelo valor de Lambda de Wilk, WL) foram realizadas duas ANOVAs, uma para cada estágio. As comparações aos pares (CA1-2 x CA1-3, CA1-2 x CA2-3, CA1-3 x CA2-3) foram realizadas com teste a posteriori de Bonferroni. SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

Apêndice E – continuação

ES60	CA1-2 (esquerdo)		CA1-3 (esquerdo)		CA2-3 (esquerdo)		CA1-2 (direito)		CA1-3 (direito)		CA2-3 (direito)	
	F _(2,113)	p	F _(2,113)	p	F _(2,113)	p	F _(2,113)	p	F _(2,113)	p	F _(2,113)	p
Interação (WL n=114)	20,349	p<0,001	75,057	p<0,001	25,810	p<0,001	39,325	p<0,001	56,448	p<0,001	6,412	p=0,002
ANOVA SOL (n=73)	F _(2,71) 300,6	p<0,01#	F _(2,71) 30,470	p<0,01#	F _(2,71) 281,2	p<0,01#	F _(2,71) 560,6	p<0,01#	F _(2,71) 44,475	p<0,01#	F _(2,71) 984,9	p<0,01#
Teta x Gama Lento		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001
Teta x Gama Rápido		p=0,260		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001
Gama Lento x Gama Rápido		p<0,001		p=0,083		p<0,001		p<0,001		p=1,000		p<0,001
ANOVA REM (n=41)	F _(2,39) 195,5	p<0,01#	F _(2,39) 252,2	p<0,01#	F _(2,39) 180,4	p<0,01#	F _(2,39) 23,693	p<0,01#	F _(2,39) 222,8	p<0,01#	F _(2,39) 166,5	p<0,01#
Teta x Gama Lento		p=0,869		p<0,001		p<0,001		p=0,011		p<0,001		p<0,001
Teta x Gama Rápido		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p=0,971		p<0,001		p<0,001
Gama Lento x Gama Rápido		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p<0,001		p=0,002		p<0,001

Tabela 6 – Valores de F e p da análise estatística com ANOVA de duas vias com medidas repetidas para a coerência em dois estágios (SOL e sono REM) em três bandas (medidas repetidas). Para cada par de áreas foram realizadas análises separadamente. O nível de significância adotado foi sempre de $p < 0,05$, mas os valores mostrados são sempre o mais preciso possível, conforme fornecido pelo programa SPSS. As análises estatísticas foram realizadas somente ipsilateralmente. Em letras pretas, à esquerda, os resultados do hemisfério esquerdo. Em branco, à direita, os resultados do hemisfério direito. A coerência entre CA1-CA2 aparece em cinza escuro, entre CA1-CA3 em cinza intermediário e entre CA2-CA3 em cinza claro. # representa p valores corrigidos pela técnica de Bonferroni, i.e., multiplicados por dois, dado que após a interação significativa (avaliada pelo valor de Lambda de Wilk, WL) foram realizadas duas ANOVAs, uma para cada estágio. As comparações aos pares (CA1-2 x CA1-3, CA1-2 x CA2-3, CA1-3 x CA2-3) foram realizadas com teste a posteriori de Bonferroni. SOL = Sono de ondas lentas, REM = sono REM.

9. Anexos

9.1. Anexo A

Cópia da Aprovação do projeto pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo 1094/06)

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

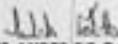
APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.11.06. **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1094/06**, intitulada: "Caracterização da interação eletrofisiológica na circuitaria hipocampal durante a aprendizagem" apresentado pelo Departamento de Radiologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX, 2, letra "c")

Pesquisador Responsável : Koichi Sameshima
Pesquisador Executante : Eduardo Ekman Schenberg

CAPPesq, 23 de novembro de 2006.

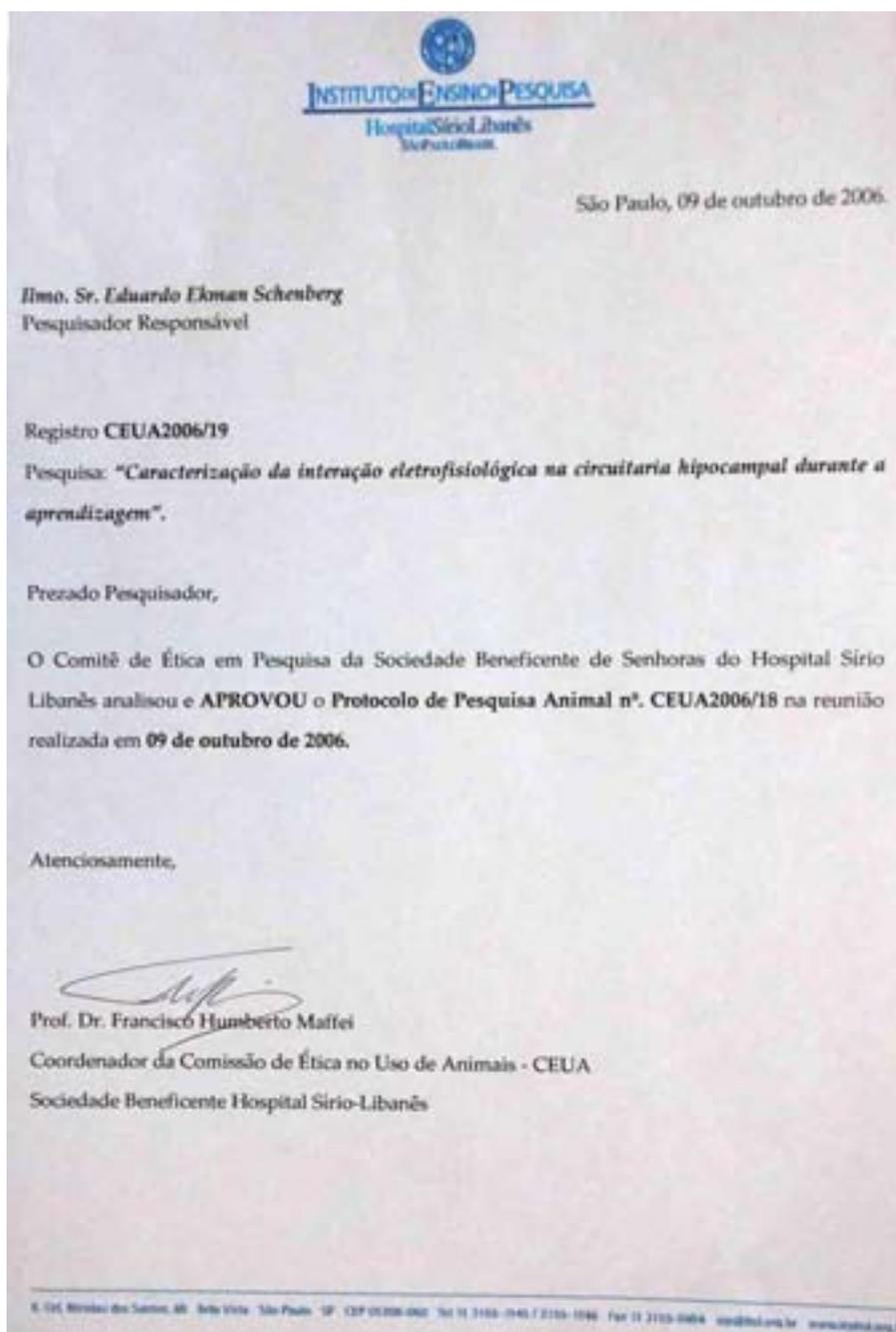

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

PROTOCC
Local:
Recebido por:
Data:

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC/FMUSP e do FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Chido-Pires de Campos, 225, 3º andar - CEP 05402-010 - São Paulo - SP
Fone: (011) 3069442 fax: (011) 3069442 e-mail: cappel@hctnet.usp.br / cappel@hctnet.usp.br

9.2. Anexo B

Cópia da aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras do Hospital Sírio Libanês (CEUA2006/19).



9.3. Anexo C

Permissão de Robert Miller para reprodução das Figuras 3 e 4 desta tese, de sua autoria. O livro em que foi publicada (MILLER, 1991) ficou muitos anos fora de circulação por desinteresse da editora. O autor recuperou os direitos autorais em 2007 e o livro está novamente disponível no endereço www.lulu.com.

From: Robert Miller <robert.miller@stonebow.otago.ac.nz>
Date: 27 de fevereiro de 2010 13h26min35s GMT-03:00
To: Eduardo Schenberg <eduardoschenberg@gmail.com>
Subject: Re: Hippocampus book

Thanks, Eduardo, I am glad you like the book and that it is still up-to-date. A lot has happened in this field since the book was originally written, and I have a plan to write a book presenting the same basic ideas, but with all the new material. Feel free to copy this figure (or others) from the thesis.

Yours sincerely,

Robert Miller

On 28/02/2010, at 3:54 AM, Eduardo Schenberg wrote:
Hi Robert,

Quite a long time since we last spoke... I read your book and I think it's great! I am finally writing my PhD thesis on the hippocampus, theta and gamma during waking and sleep, and I would like to know if I could have your permission to reproduce some figures of your book "Cortico Hippocampal Interplay", especially figure 39 from page 161

thank you very much

eduardo schenberg

On Thu, Mar 8, 2007 at 7:37 PM, Robert Miller <robert.miller@stonebow.otago.ac.nz> wrote:
Dear Eduardo,

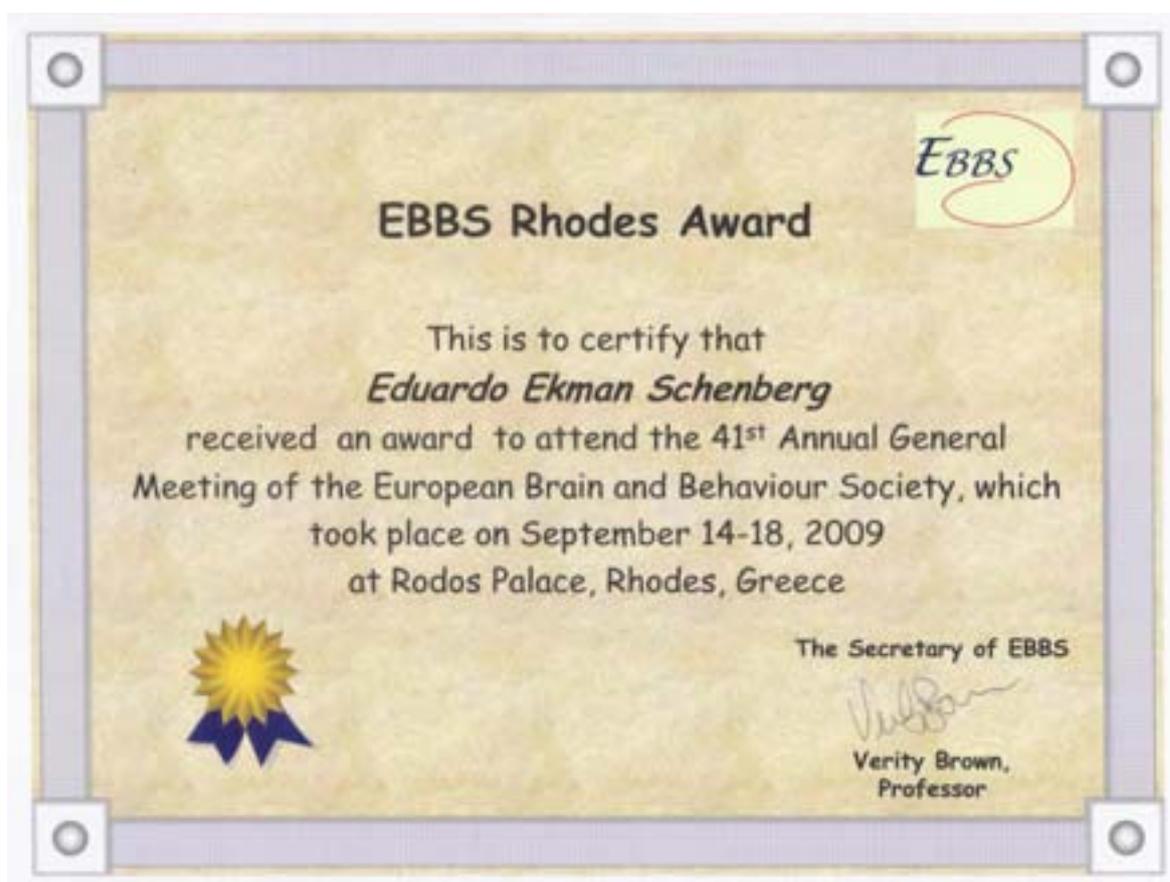
Thank you for your message. The hippocampus book is now properly formatted and almost ready to go on my website. However, I have had to obtain copyright clearance for all figures (etc) used from other published sources, and I am still waiting for a couple of these. I will be traveling for about a month, getting back to New Zealand on April 6th. By then, I should be ready to open the website. Its address will be: www.robertmiller-octspan.co.nz. (This address does not yet access anything, I should say). I will arrange the website so there is a small charge for downloading my book, to cover my own expenses in setting it up.

Thank you for your interest.

Robert Miller

9.4. Anexo D

Cópia de certificado do prêmio **EBBS Rhodes Award** recebido na 41ª Reunião da European Brain and Behavior Society (EBBS), em Rhodes, Grécia, 2009; e do respectivo resumo do painel científico, publicado na *Frontiers In Behavioral Neurosciences* (próxima página).



Anexo D – continuação

POSTER PRESENTATION

Electrophysiological characterization of hippocampal ensembles during the sleep-wake cycle

Eduardo E Schenberg^{1*}, Rafael P Proenca¹, Carlos S. N Brito¹, Birajara S Machado², Edgard Morya³, Miguel A Nicoletis^{1,4} and Koichi Sameshima^{1,3}

- 1 University of Sao Paulo , São Paulo, Brazil
- 2 Radiology Department, University of Sao Paulo , São Paulo, Brazil
- 3 Alberto Santos Dumont Association for Reserch Support, Educational and Research Institute of the Sirio-Libanes Hospital, São Paulo, Brazil
- 4 Center of Neurobiology, Duke University, International Institute of Neuroscience of Natal – Edmond e Lily Safra, Natal, Brazil

Given the hippocampus involvement in learning and memory processes, we are seeking to electrophysiologically characterize hippocampal activities during the sleep-wake cycle to further assess how it processes distinct aspects of memory formation. Custom high-density microwire arrays were implanted in male Wistar rats. Local-field potentials (LFP) and multi-unit spiking activity were recorded in freely behaving rats while habituating to a novel environment. Video recordings and LFPs were used to classify different stages of the sleep-wake cycle.

LFP complexity was estimated through the sample entropy measure of 1 sec epoch. Its mean and std. dev. were calculated for each stage: active waking, 1.98 ± 0.23 ; quiet waking, 1.91 ± 0.25 ; drowsy, 1.69 ± 0.22 ; slow wave sleep, 1.52 ± 0.22 ; REM sleep, 1.90 ± 0.22 . ANOVA revealed significant difference between stages ($F_{4,21649}=4197$, $p<0.01$). All values were significantly different (post-hoc Scheffé test, $p<0.05$), except REM sleep and quiet waking stages pair.

Preliminary spike analysis revealed a large variance in amplitude ($143.7 \pm 75.3 \mu V$) and width ($359.2 \pm 188.2 \mu s$), possibly due to electrode tip distance to cell layer, subregion and cell type variabilities. The amplitude/width measure of 11 cells (20.8%) were typical of pyramidal cells ($314.8 \pm 51.4 / 381.0 \pm 76.6$), 23 (43.4%) of interneurons ($125.4 \pm 44.4 / 197.8 \pm 99.1$), and 19 (35.9%) of intermediate value ($147.2 \pm 33.7 / 388.2 \pm 98.1$).

Each stage showed distinct entropy values, reflecting particular neural dynamics at each stage; the spike characteristics such as amplitude and width can be used to classify cell into putative pyramidal or inhibitory type, but additional measures such as firing frequencies and burst properties might allow for a better cell classification. Then we envisage analyzing interaction between spiking dynamics and entropy measures at each stage.

Financial Support: AASDAP, CAPES, CNPq, FAPESP, IBRO, IEP-HSL.

Conference: 41st European Brain and Behaviour Society Meeting. Rhodes Island, Greece, September 13 - 18, 2009.

Citation: Schenberg EE, Proenca RP, Brito CS, Machado BS, Morya E, Nicoletis MA and Sameshima K (2009). Electrophysiological characterization of hippocampal ensembles during the sleep-wake cycle. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Conference Abstract: 41st European Brain and Behaviour Society Meeting. doi: 10.3389/conf.neuro.08.2009.09.293

Copyright: © 2009 Schenberg, Proenca, Brito, Machado, Morya, Nicoletis and Sameshima. This is an open-access publication subject to an exclusive license agreement between the authors and the Frontiers Research Foundation, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original authors and source are credited.

*Correspondence: Eduardo E Schenberg, University of Sao Paulo – USP, São Paulo, Brazil. eduardoschenberg@gmail.com

“The answer is never the answer.

What's really interesting is the mystery.

If you seek the mystery instead of the answer,

you'll always be seeking.

I've never seen anybody really find the answer.

- They think they have, so they stop thinking.

*But the job is to seek mystery, evoke mystery, plant a garden in which strange plants grow
and mysteries bloom.*

The need for mystery is greater than the need for an answer.”

Ken Wilber
