

Helder Rui Cardoso da Cruz

**AS OSCILAÇÕES TÁLAMO-CORTICAIS:
ALGORITMOS PARA PESQUISA DE PADRÕES
NEURONAIIS**



Departamento de Matemática Aplicada
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
PORTO / 2008

Joaquim Fernando Pinto Corte

Helder Rui Cardoso da Cruz

**AS OSCILAÇÕES TÁLAMO-CORTICAIS:
ALGORITMOS PARA PESQUISA DE PADRÕES
NEURONIAIS**



*Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para a obtenção do grau de Mestre em Bioinformática.*

Departamento de Matemática Aplicada
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
PORTO / 2008

Tipo de divulgação	Âmbito de divulgação	Formato do ficheiro
<input checked="" type="checkbox"/> Total Parcial	<input checked="" type="checkbox"/> na UP Geral	<input checked="" type="checkbox"/> Papel <input checked="" type="checkbox"/> Digital (CD/DVD)

Divulgação no Departamento de MATEMÁTICA DA UNIVERSIDADE DO PORTO
Reservado a:
Data de devolução: 29 05 08
Nº de registo: 5281
Cota: QAB.3.m2008 CAUCHO

*“Aqueles que sonham acordados têm consciência de mil coisas que escapam
aos que apenas sonham adormecidos.”*

Edgar Allan Poe (1809-1849)

Dissertação de Mestrado em Bioinformática apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Doutora Ana Paula Rocha, Professora Auxiliar de Matemática Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e Investigadora do Centro de Matemática da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (CMUP); e do Professor Doutor Vasco Miguel Clara Lopes Galhardo, Professor Auxiliar de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e Investigador do Grupo de Morfofisiologia do Sistema Somato-sensitivo do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) da Universidade do Porto.

O trabalho experimental em animais foi realizado nos laboratórios do Grupo de Morfofisiologia do Sistema Somato-sensitivo do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto.

AGRADECIMENTOS

O trabalho que se apresenta é fruto de uma colaboração intensa de diversas pessoas às quais desejo manifestar os meus sinceros agradecimentos.

De um modo muito especial aos meus orientadores, Professora Doutora Ana Paula Rocha e Professor Doutor Vasco Galhardo, pela disponibilidade demonstrada ao longo deste trabalho, por todas as sugestões apresentadas bem como pela disponibilização de todos os meios necessários à pesquisa científica que tornaram possível a execução deste trabalho;

Aos colegas de laboratório Eng. Luís Mendonça, Dr. Paulo Aguiar, Dra. Clara Monteiro, Dr. Miguel Pais Vieira, Dr. Albino Maia pela constante troca de ideias, informações e pela leitura atenta do trabalho;

Ao Doutor Damien Gervasoni e ao Doutor Shih-Chieh Lin pelas funções em MatLab cedidas para a análise de dados;

Finalmente aos meus pais pelo apoio incondicional em todas as fases de elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
RESUMO	III
SUMMARY	V
CAPÍTULO I – <i>Introdução</i>	1
1.1. Os registos neuronais.	2
1.1.1. Potenciais de acção e potenciais de campo locais.	3
1.2. O sistema somato-sensitivo do rato.	5
1.2.1. Tálamo.	7
1.2.2. CórTEX.	9
1.3. A dor neuropática.	10
1.3.1. A dor neuropática periférica e central.	11
1.4. Modelos para o estudos da dor.	12
1.4.1. Modelo de dor inflamatória.	12
1.4.2. Modelos de dor neuropática periférica.	13
1.5. A dor e os estados comportamentais neuronais.	15
1.6. Objectivos do trabalho e abordagem técnica.	17
CAPÍTULO II – <i>Metodologia</i>	19
2.1. Modelo animal.	20
2.2. Microcirurgia.	20
2.3. Registos neuronais.	24
2.4. Análise de comportamento.	25
2.4.1. Modelo I – Dor inflamatória.	25
2.4.1.1. Algorítmo para a detecção de oscilações nos sinais de LFPs tálamo-corticais.	26
2.4.2. Modelo II – Dor neuropática periférica.	28
2.4.2.1. Análise das transições comportamentais.	31
2.4.2.2. Construção do mapa 2-D de estados comportamentais.	32
2.5. Análise de Dados.	34
2.6. Histologia.	35

CAPÍTULO III – <i>Resultados</i>	37
3.1. Modelo I – Dor inflamatória.	38
3.1.1. Comportamentos nociceptivos associados à aplicação periférica de formol.	38
3.1.2. Actividade neuronal.	39
3.1.3. Actividade neuronal correlacionada.	41
3.1.4. Padrões de codificação neuronal.	42
3.1.5. Características espectrais dos potenciais de campo locais.	44
3.1.6. Algoritmo de procura.	48
3.1.7. Histologia.	50
3.2. Modelo II – Dor neuropática periférica.	51
3.2.1. O modelo animal de dor.	51
3.2.2. Definição de estados e características espectrais.	52
3.2.3. Estados de comportamento neuronal e a condição de dor.	58
3.2.4. Transições entre estados de comportamento neuronais.	64
CAPÍTULO IV – <i>Discussão</i>	69
4.1. Modelo I – Dor inflamatória.	70
4.2. Modelo II – Dor neuropática periférica.	80
CAPÍTULO V – <i>Considerações Finais</i>	83
CAPÍTULO VI – <i>Referências Bibliográficas</i>	87
CAPÍTULO VII – <i>Anexos</i>	99
A.1. GUISpecgram.	100
A.2. Função FindContra.	106
A.3. Função StatHypnoALL.	112
A.4. Função States.	113
A.5. Função noState.	114

LISTA DE ABREVIATURAS

- CCI**, Modelo de dor neuropática, por constrição crónica do nervo ciático.
- CFA**, Modelo de dor inflamatória, por indução de monoartrite crónica através da injecção do complexo adjuvante de Freund.
- CCHs**, Histogramas de correogramas cruzados.
- DV**, Dorso-ventral.
- FOH**, Formol.
- FPE**, Eventos falsos – positivos.
- LFPs**, Potenciais de campo locais.
- LTS**, Potenciais de acção de baixo limiar.
- ML**, Medio-lateral.
- OE**, Eventos observados.
- PSDs**, Histogramas de densidade espectral de potência.
- PSTH**, Histogramas peri-evento.
- RC**, Rostro-caudal.
- REM**, Sono de fase REM, Movimento Rápido dos Olhos, também denominado por sono paradoxal.
- SI**, CórTEX somato-sensitivo primário.
- SII**, CórTEX somato-sensitivo secundário.
- SNI**, Modelo de dor neuropática, por lesão do nervo ciático.
- SWS**, Sono lento profundo, também denominado como sono delta ou sono não-REM.
- TC**, Tálamo-cortical.
- TPE**, Eventos verdadeiros – positivos.
- VPL**, Núcleo talamico ventro-posterior-lateral.
- VPM**, Núcleo talamico ventro-posterior-medial.
- WK**, Estado acordado ou de vigília.
- WT**, Oscilação rítmica dos bigodes.

RESUMO

Na actualidade é reconhecido que os síndromes de dor crónica são acompanhados por alterações profundas a nível sensorial, cognitivo, emocional e social. Estas alterações estão em parte associadas à reorganização funcional das populações neuronais da via lateral do eixo tálamo-cortical, que contém áreas cerebrais importantes no processamento da informação sensori-discriminativa da estimulação nociceptiva, como a duração, localização, intensidade e qualidade do estímulo, sobre as quais incide a maior parte das abordagens terapêuticas. Todavia, os mecanismos tálamo-corticais envolvidos no processamento da informação nociceptiva continuam até à data ainda pouco estudados.

Com o presente estudo pretendeu-se descrever a dinâmica tálamo-cortical procurando assinaturas específicas na actividade neuronal correlacionadas com o processamento doloroso. Para este objectivo foram estudados dois modelos animais de dor em ratos machos adultos da estirpe *Sprague-Dawley*, um modelo de dor de cariz inflamatório por injecção periférica de formol (Duboisson and Dennis, 1977) (Modelo de dor I) e um modelo de dor neuropática periférica por lesão do nervo (*spared nerve injury*, SNI) (Decosterd and Woolf, 2000) (Modelo de dor II). Os registos neuronais foram implementados com o recurso a matrizes de micro-eléctrodos com alinhamento específico implantadas a nível do córtex somato-sensitivo primário (SI) e do núcleo talámico ventro-posterior-lateral (VPL). Através de cada micro-eléctrodo foi registada em simultâneo a actividade intracraniana neuronal e os potenciais de campo locais (LFPs). A análise da actividade neuronal contemplou a implementação de algoritmos para o processamento do sinal direcionados para a pesquisa de padrões neuronais associados ao processamento da informação dolorosa.

A injecção periférica de formol (Modelo de dor I) induziu um acréscimo do número de neurónios com actividade correlacionada, nas e entre as áreas cerebrais registadas. Por outro lado, a inspecção dos LFPs tálamo-corticais revelou a existência de alterações na

densidade espectral de potência a nível da banda de frequência *theta* (4-9 Hz). Estas oscilações demonstraram estar correlacionadas com a execução de contrações musculares espontâneas da pata injectada com formol decorrentes de alterações do nível de dor, ocorrendo numa janela temporal de 250 a 500 mseg. prévia ao comportamento. Tendo como base estes padrões de oscilação do sinal foi construído um algoritmo com o objectivo de detectar as oscilações neuronais que precedem a génesis do comportamento observado. Através da comparação com os tempos observados em video, o algoritmo implementado revelou uma elevada percentagem de acerto (65-70%) na detecção do tempo de ocorrência do comportamento considerado para as duas regiões registadas. O conhecimento deste tipo de oscilações poderá ser aplicado no desenvolvimento de sistemas de micro-estimulação pontual controlados por *feedback* neuronal para a atenuação deste tipo sintomatologia dolorosa, aumentando a sua eficiência a longo-prazo evitando mecanismos centrais de habituação ao estímulo.

Com o modelo de dor neuropática SNI (Modelo de dor II) foram observadas algumas alterações a nível dos estados comportamentais neuronais associados ao ritmo circadiano do rato. Durante o período de dor foi observada uma redução do tempo dispensado no estado *slow-wave-sleep* (SWS), um aumento no estado de transição U e não foram encontradas diferenças para o estado acordado (WK). O número de episódios dos estados WK e SWS sofreram uma diminuição que não foi acompanhada por alterações na duração média de cada episódio. Por outro lado, o número de episódios do estado U aumentou significativamente revelando paralelamente uma diminuição da duração média de cada episódio. O número de transições entre os estados WK, SWS e REM aumentou durante o período de dor, e este aumento poderá estar associado a um acréscimo do número de episódios do estado U. As alterações observadas com o modelo de dor crónica SNI a nível da duração, episódios e transições entre estados comportamentais sugerem uma degradação da estrutura do ciclo circadiano do rato durante o período de dor crónica.

SUMMARY

It is currently assumed that chronic pain syndromes induce profound changes at the sensorial, cognitive, emotional and social levels. These changes are probably related with functional reorganization of the neuronal populations in the lateral pathway of the thalamocortical axis that are involved in the processing of the discriminative aspects of the nociceptive stimulation, such as its duration, localization, and intensity. Most therapeutical approaches are in fact targeted to this lateral pathway. However, the thalamocortical mechanisms involved in the processing of nociceptive information remain poorly understood.

This study aims at the description of the thalamocortical neuronal dynamics during processing of nociceptive information. For this purpose two pain models were used. The first one was an inflammatory model using peripheral formalin injection (Duboisson and Dennis, 1977), and the second one was a neuropathic model using the spared-nerve-injury (SNI) technique developed by Decosterd and Woolf (2000). Extracellular neuronal recordings were made with chronically implanted matrices of multielectrodes, targeted at the primary somatosensory cortex (SI) and ventro-posterior-lateral thalamic nuclei (VPL). Neuronal data analysis contemplated the implementation of several signal-processing algorithms to search for neuronal patterns associated with nociceptive information processing.

The peripheral formalin injection (Model I) induced an increase of the cross-correlated activity between the neurons of the recorded areas. Moreover, the thalamocortical LFPs presented changes in the power spectral density within the *theta* frequency band (4-9 Hz). These oscillations were correlated with the spontaneous muscular contractions exhibited by the injected hind-paw that occur 250-500 msec before the behavior. We developed an algorithm able to detect the timestamps of these neuronal oscillations. Comparison of the timestamps of the muscular contractions with the events of

neuronal oscillations detected by the algorithm revealed that in 65-70% of the cases the algorithm predicted the occurrence of a contraction. This knowledge on the oscillations patterns can be used on the development of neuronal-controlled micro-stimulation systems for attenuation of chronic pain symptoms, increasing its efficiency over time.

The SNI surgery (Model II) induced alterations in the neuronal behavioral states of the circadian rhythm. During the pain period, the time allocated to slow-wave-sleep state (SWS) reveal a decrease, while the U-transition state increases, and the waking state (WK) did not change. The WK and SWS episodes presented a decrease while the mean duration of each episode remained the same. On the other hand, the number of U state episodes presented an increase and the mean duration of each episode a decrease. The transitions between WK, SWS, and REM states increased during the pain period. In addition, this increase could be associated with an increase of the U state episodes. The present data shows that chronic neuropathic pain produces clear disturbances in the number episodes and transitions between behavioral neuronal states of the circadian rhythm, as well as to its durations. In addition, the significant increase of the total time allocated to the U-transition state and its number of episodes suggests its importance to the installation of a chronic pain syndrome.

Capítulo I – Introdução

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neurais

I – INTRODUÇÃO

1.1. OS REGISTOS NEURONIAIS

Os neurofisiologistas acreditam que quando um estímulo é aplicado ao mesmo tempo que é registada a actividade neuronal numa determinada zona do cérebro, que esta responde a este estímulo. O estímulo pode ser de natureza física, tal como, uma luz utilizada para estimular os neurónios retiniais ou geniculares, ou um som utilizado para a estimulação do córtex auditivo. O estímulo pode ser ainda de cariz abstracto ou cognitivo, como uma tarefa de memória, utilizado para induzir actividade neuronal no hipocampo ou no córtex pré-frontal.

O registo da actividade de neurónios em modelos animais possibilitou importantes descobertas, nomeadamente a nível da compreensão do modo como o cérebro processa a informação. David Hubel e Torsten Wiesel (ver como revisão, Hubel and Wiesel, 1998) foram dos primeiros cientistas a registaram a actividade de neurónios individuais. O seu trabalho em gatos a nível do córtex visual primário (V1) explicando como os neurónios desta área respondiam a diversos estímulos valeu-lhes a atribuição do Prémio Nobel em Fisiologia e Medicina de 1981.

Os registos neuronais extracelulares são uma técnica relativamente recente. Este tipo de registos pode ser classificado em duas categorias, os registos agudos resultantes do registo da actividade neuronal em animais sob o efeito de anestesia e os registos crónicos em animais despertos. Esta técnica é caracterizada pela introdução de um ou mais eléctrodos no cérebro de um animal vivo para a detecção da actividade eléctrica gerada pelos neurónios adjacentes ao eléctrodo.

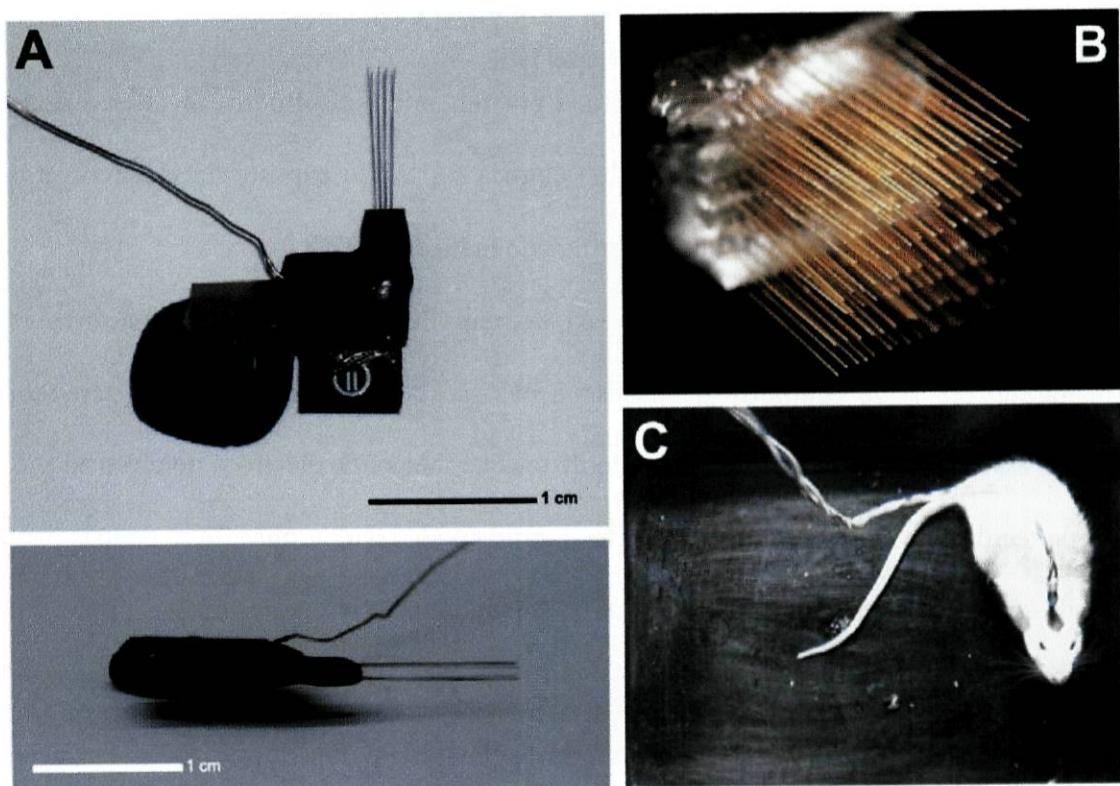


Figura 1.1.1. – (A) Matriz de micro-eléctrodos com arquitectura em 4x2 e espaçamento fixo entre os filamentos de tungsténio com isolamento de Isonel. (B) Matriz de micro-eléctrodos com arquitectura em 16x16 utilizada para o registo da actividade cortical em macaco. (C) Rato implantado cronicamente com duas matrizes de micro-eléctrodos similares à representada em A), a nível do córtex somato-sensitivo primário (SI) e núcleo talâmico ventro-posterior-lateral (VPL).

Os primeiros micro-eléctrodos utilizados para o registo de extracelular da actividade de neurónios começaram por ser implementados com o recurso a micropipetas de vidro, com uma solução interna similar em composição à do fluido extracelular. Mais recentemente são utilizados micro-eléctrodos construídos a partir de vários tipos de materiais para condução eléctrica (p.e. aço, tungsténio, etc.) e isolamento (p.e., teflon, ceras, etc.) (Figura 1.1.1.A-B.). O diâmetro e o espaçamento dos micro-filamentos também pode variar consoante as características dos neurónios a registar.

1.1.1. POTENCIAIS DE ACÇÃO E POTENCIAIS DE CAMPO LOCAIS

A propriedade física que é mensurada por um micro-eléctrodo é a diferença de potencial eléctrico (quantificada em μ -volts) entre a superfície exposta do eléctrodo e o eléctrodo de referência colocados num determinado meio.

Num fluído de origem não biológica existem flutuações pequenas mensuráveis próximas do ponto de equilíbrio. Estas flutuações são conhecidas como ruído térmico, surgindo associadas ao movimento aleatório de iões no meio e de electrões no eléctrodo. A nível do tecido nervoso a abertura de um canal iónico pode resultar num fluxo de iões para a célula a partir do meio extracelular, ou o inverso. Estas correntes locais produzem alterações do potencial entre o meio extracelular local dos eléctrodos e o meio intracelular. O somatório dessas correntes locais à superfície do eléctrodo define as oscilações de tensão registadas no sinal.

Os potenciais de acção dos neurónios são ondas de descarga eléctrica que percorrem a membrana da célula, sendo essenciais para o rápido transporte de informações entre e dentro dos tecidos. Os potenciais de campo locais (LFPs) são uma classe particular de sinais electrofisiológicos representando o somatório das flutuações de toda a actividade sináptica dendrítica dentro de um volume de tecido, sendo que estão correlacionados com o grau de coerência na actividade da população de neurónios à periferia do eléctrodo (Lopes da Silva, 1991). O sinal é registado utilizando micro-eléctrodos extracelulares de baixa impedância ou alternativamente através dos mesmos eléctrodos utilizados para o registo de potenciais de acção. Tradicionalmente é utilizado um filtro passa-baixo, com uma frequência de corte de aproximadamente 300 Hz. A baixa impedância e o posicionamento do eléctrodo possibilitam o registo da actividade de um número elevado de neurónios de contribuem para o sinal. O sinal não filtrado reflecte o conjunto de todos os potenciais de acção das células situadas num raio de 50 a 350 μ m em relação ao eléctrodo (Legatt et al.,

1980) e pequenos eventos iónicos num raio de 0.5 a 3 mm (Juergens et al., 1999). O filtro passa-baixo remove a componente de potenciais de acção do sinal e deixa a baixa frequência, os LFPs.

Quando são utilizadas matrizes de micro-eléctrodos existe a possibilidade de formação de tecido fibroso na periferia das pontas dos micro-eléctrodos. Este tecido tende a atenuar o sinal dos potenciais de acção dos neurónios na periferia dos eléctrodos, contudo os sinais dos LFPs são menos afectados permitindo um registo estável a mais longo prazo (Pesaran et al., 2002).

Recentemente têm vindo a ser desenvolvidos esforços aplicando este tipo de registo de sinal, no sentido de compreender a contribuição das estruturas neuronais no normal funcionamento do cérebro. Alguns desses estudos estão ligados à investigação da génese de patologias motoras (Weinberger et al., 2006), epilepsia (Pinault, 2003), Parkinson (Soikkeli et al., 1991; Kühn et al., 2006) ou dor crónica (Yamamoto et al., 2006).

1.2. O SISTEMA SOMATO-SENSITIVO DO RATO

O sistema somato-sensitivo do rato é largamente reconhecido pela sua versatilidade. Tal como acontece em outros circuitos sensoriais é formado por uma via ascendente e uma descendente, que actuam a vários níveis dos núcleos corticais, subcorticais e talâmicos (Nicolelis and Fanselow, 2002b; Castro-Alamancos, 2004). As áreas corticais e talâmicas são densamente e reciprocamente interconectadas (Jones and Pons, 1998; Steriade, 1999). No entanto, as projecções descendentes do córtex para o tálamo são sete a dez vezes superiores às projecções ascendentes do tálamo para o córtex (Bourassa and Deschênes, 1995; Liu and Sandkühler, 1995).

Na literatura encontram-se numerosos estudos aplicando técnicas *in vivo* em animais anestesiados e acordados têm abordado o papel funcional do sistema tálamo-cortical (Llinás, 1988; Steriade, 1999). Ao nível celular no tálamo as propriedades dos canais iónicos surgem associadas ao aparecimento de padrões de actividade específicos. Em particular, os padrões de actividade de disparo dos neurónios em *burst* que estão conotados com cálcio em baixos limiares (*low-threshold calcium spike*, LTS) e com estados de hiper-polarização positiva das membranas (Llinás, 1988; Steriade, 1999). Ao nível do funcionamento em rede, os padrões temporais e espaciais da actividade cortical e talâmica demonstraram uma grande variabilidade, sugerindo que o circuito tálamo-cortical suporta uma vasta gama de interacções necessárias para a análise da informação sensorial, programação motora e funções cognitivas (Llinas and Ribary, 1998; Steriade et al., 1993; Steriade, 2001; Alitto and Usrey, 2003).

Alguns investigadores defendem que a informação sensorial é transmitida do tálamo para o córtex unicamente durante padrões de actividade tónica, e que nenhuma informação é transmitida durante o padrão de actividade em *burst* (Steriade et al., 1993). Esta ideia foi recentemente posta em causa com dados experimentais apresentando neurónios do núcleo geniculado lateral (LGN) a transmitir informação visual durante os dois padrões de actividade (Guido and Weyand, 1995; Weyand et al., 2001). No entanto a natureza do sinal transmitido difere entre os dois modos de actividade. Fanselow e colaboradores (2001) demonstraram que os *burst* talâmicos podem ocorrer durante os estados de vigília, todavia a sua prevalência é menor quando comparada com o estado de sono *slow-wave-sleep* (SWS). Este padrão foi encontrado no sistema tálamo-cortical na sequência das oscilações na banda 7-12 Hz durante o movimento rítmico dos bigodes do rato (*whisker-twitching*) (Fanselow and Nicolelis, 1999). Durante o modo de disparo em *burst* os neurónios talâmicos estão afinados para detecção de alterações rápidas dos sinais

sensoriais e transmissão da informação da sua presença para o córtex (Fanselow et al., 2001; Nicolelis and Fanselow, 2002a; 2002b; Wiest and Nicolelis, 2003).

1.2.1. TÁLAMO

Embora a informação nociceptiva atinja muitos alvos supraespinhais, o tálamo continua a ser considerado como uma estrutura fundamental para a percepção da dor. A combinação de estudos anátómicos, electrofisiológicos, psicofísicos e imagiológicos indicaram que os diversos núcleos talâmicos desempenham funções diversas e complementares no processamento da informação nociceptiva (Castro-Alamancos, 2004).

O complexo ventro-basal do tálamo, constituído pelos núcleos ventro-posterior-medial (VPM) e ventro-posterior-lateral (VPL) está predominantemente envolvido na componente sensori-discriminativa da dor. Esta região recebe a maioria das aferências provenientes da componente lateral do feixe espinho-talâmico que conduzem a informação originada nos neurónios *wide-dynamic-range* (WDR) da medula espinhal, os quais codificam a localização e intensidade dos estímulos. À semelhança dos neurónios WDR, alguns neurónios dos núcleos VPM/VPL têm campos receptivos restritos e a intensidade da sua resposta está correlacionada positivamente com a intensidade do estímulo. Estes neurónios têm como alvo principal o córtex somato-sensitivo primário (SI), o qual também está envolvido nos aspectos sensori-discriminativos da dor.

Capítulo I – Introdução

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais

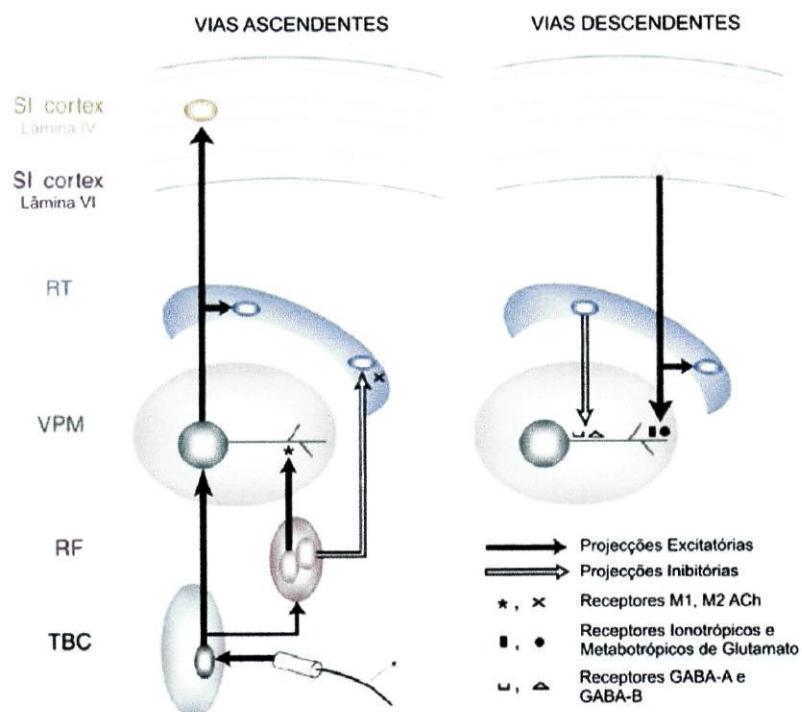


Figura 1.3.1. – Diagrama das vias ascendentes e descendentes do *loop* tálamo-cortical no rato. SI, córtex somato-sensitivo primário; RT, núcleo reticular; VPM, núcleo talâmico ventro-posterior-medial; RF, formação reticular; TBC, complexo trigeminal. Adaptado de Nicolelis e Fanselow (2002b).

Os núcleos mais mediais do tálamo, incluindo o núcleo ventro-medial-posterior (VMpo) e a porção ventral da zona medio-dorsal do tálamo (MDvc), recebem predominantemente informação de neurônios nociceptivos específicos localizados na lâmina I da medula espinhal, através da componente medial do feixe espinho-talâmico (Craig and Dostrovsky, 1991; Craig, 2004). Os neurônios destes núcleos, tal como os do núcleo ventro-posterior-inferior (VPI), têm campos receptivos difusos, frequentemente bilaterais, e projectam para o córtex somato-sensitivo secundário (SII), córtex cingulado anterior (ACC) e outras áreas do sistema límbico. Por isso pensa-se que estes núcleos talâmicos estão particularmente envolvidos na componente emocional e cognitiva da dor.

1.2.2. CÓRTEX

Os estímulos nociceptivos activam neurónios em várias zonas corticais. O córtex somato-sensitivo primário (SI) tem sido considerado como o centro de percepção da dor. Recebe aferências dos núcleos talâmicos envolvidos na componente sensori-discriminativa da dor (VPM/VPL), possui neurónios do tipo NS e WDR com campos receptivos pequenos localizados contralateralmente.

A lesão do córtex SI reduz a capacidade de discriminar a intensidade e a localização da dor, mas não atenua de forma marcada a dor (Peyron et al., 2004), o que está de acordo com a noção de que a dor resulta da activação de uma vasta rede neuronal que envolve diversas estruturas corticais e subcorticais (Melzack and Casey, 1968; Casey et al., 1996; Kim, 2007). Apesar da importância indiscutível do córtex SI na percepção da dor, segundo alguns autores a típica via que liga a área sensitiva primária da medula espinhal ao córtex SI através do feixe espinho-talâmico e dos núcleos VPM/VPL, não é a mais relevante para a dor observada na prática clínica (Sewards and Sewards, 2002).

Estudos imagiológicos demonstraram que os estímulos nociceptivos activam diversas zonas corticais, para além do córtex somato-sensitivo primário (SI) e secundário (SII) (Casey et al., 1996; Davis et al., 1998). Uma dessas áreas constantemente activada pelos estímulos nociceptivos é o córtex cingulado (ACC) (Davis et al., 1998), que recebe aferências dos núcleos talâmicos mediais (Hsu and Shyu, 1997), estando envolvido na componente cognitivo-emocional da dor (Casey et al., 1996). Os seus neurónios possuem campos receptivos que frequentemente englobam todo o corpo, ou metade dele. A lesão desta área cortical pode reduzir a dor crónica, tal como observado em modelos animais (Vaccarino and Melzack, 1992) e no homem (Wilkinson et al., 2000). Outras das áreas

envolvidas na componente cognitivo-emocional são o córtex insular (Roman et al., 2006) e o córtex pré-frontal medial (Casey et al., 1996; Baliki et al., 2003).

1.3. A DOR NOCICEPTIVA

Os neurónios do sistema nervoso periférico responsáveis pela detecção e transmissão dos estímulos dolorosos são denominados por nociceptores. Como qualquer neurónio aferente primário possuem um corpo celular, localizado nos gânglios das raízes dorsais da medula espinhal, do qual parte um prolongamento que se bifurca, originando um processo central que se dirige e termina no corno dorsal da medula espinhal, e um prolongamento periférico que vai terminar nos diversos órgãos periféricos.

De acordo com o diâmetro, mielinização e velocidade de condução das fibras sensitivas cutâneas, estas dividem-se em três grupos principais: A β , A δ e C (Willis et al. 1991). Em condições fisiológicas normais, qualquer destes tipos de fibras pode transmitir informação inócuia, mas apenas as fibras C e A δ transmitem informação nociceptiva. Quando um estímulo nociceptivo é aplicado na pele, os nociceptores A δ são responsáveis pela dor aguda imediata, a qual é seguida por uma dor mais difusa provocada pela activação dos nociceptores do tipo C de condução mais lenta. Na presença de inflamação tecidual ou após lesão dos nervos periféricos, podem ocorrer alterações neuroquímicas e anatómicas dos neurónios A β , que podem provocar dor mediada por estes aferentes primários.

Os estímulos que provocam a activação dos nociceptores designam-se nociceptivos ou nôxicos, e podem classificar-se em mecânicos, térmicos ou químicos. A principal função dos nociceptores é transformar a energia patente nos estímulos nociceptivos em

impulsos nervosos, ou seja, potenciais de acção, e conduzi-los até à medula espinhal. A grande maioria dos nociceptores do tipo C designam-se por polimodais por serem sensíveis às três classes de estímulos. No entanto, alguns nociceptores do tipo C apenas são sensíveis a estímulos térmicos ou mecânicos, ou a ambos (Belmonte and Cervero, 1996). Quanto aos nociceptores A δ , existem dois grupos principais. Os do tipo I são activados predominantemente por estímulos mecânicos em condições fisiológicas normais, mas também podem responder a estímulos térmicos ou químicos de longa duração, ou após sensibilização (Treede and Magerl, 1992). Os nociceptores A δ do tipo II respondem predominantemente a estímulos térmicos e são insensíveis a estímulos mecânicos (Treede et al., 1998; Pogatzki et al., 1992).

1.3.1. A DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA E CENTRAL

A dor neuropática é por definição uma dor que resulta de lesão ou disfunção do sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP). São vários os mecanismos que podem contribuir para o aparecimento de sintomatologia dolorosa associada a neuropatias periféricas. Um dos mais estudados relaciona-se com o aparecimento de focos geradores de impulsos nervosos. Na maior parte dos pacientes com dor neuropática esta tem origem na lesão parcial ou total de nervos, como é o caso de amputações de membros. Neste último caso a dor é de uma classe especial geralmente designada por dor fantasma “*phantom limb pain*”. Outros casos de dor neuropática surgem associados a neuropatias diabéticas, neuralgias, neuropatias toxicológicas, traumas ou neuropatias de compressão, queimaduras, dor ao choque ou tacto, como hipersensibilidade incluindo alodínia e hiperalgesia (Bennett, 1994; Koltzenburg, 1998).

A dor neuropática central ocorre após lesão medular (degenerativa, traumática ou isquémica), ou pode resultar por exemplo de patologias como a esclerose múltipla, a doença de Parkinson ou lesões isquémicas em consequência de acidentes vasculares cerebrais. Ao contrário do que acontece na dor neuropática periférica, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela dor neuropática central estão ainda mal estudados. Este facto estará seguramente relacionado com a inexistência de bons modelos experimentais de dor neuropática central, contrariamente ao que sucede com a dor neuropática periférica. A maioria dos estudos sobre a fisiopatologia da dor neuropática central aponta para a ocorrência de fenómenos de desinibição por redução da acção do GABA (Fukuoka et al., 1998; Eide, 1998), o neurotransmissor inibitório mais abundante no sistema nervoso central.

1.4. MODELOS PARA O ESTUDO DA DOR

1.4.1. MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA

O sistema somato-sensitivo está envolvido em funções de alerta para detecção de danos periféricos potenciais em tecidos ou nervos, que possam levar ao desenvolvimento de estados patológicos particulares. Dentro destes estados podem manifestar-se reduções do limiar necessário para a sensação de dor (alodínia), um aumento da resposta a estímulos dolorosos (hiperalgesia), um aumento da duração da resposta à estimulação de curta duração (dor persistente), uma propagação da dor e hiperalgesia em tecidos adjacentes (hiperalgesia secundária).

Alguns mecanismos neuronais periféricos como a sensibilização de nociceptores e respostas neurogénicas contribuem para a patologia dolorosa na fase inicial, durante a qual

a lesão do tecido e a inflamação prevalecem. Por outro lado, a persistência de sintomatologias dolorosas após a recuperação do dano do tecido, indicam o envolvimento de alterações a nível de funções do sistema nervo central. Alguns estudos indicaram que a dor persistente induzida por lesões a nível tecidual pode ser atenuada através do pré-tratamento da região a lesionar com anestésicos ou opióides, sugerindo a existência de uma contribuição da plasticidade a nível central para a dor nociceptiva (Seltzer et al., 1991; Dallel et al., 1995).

O modelo de dor de cariz inflamatório mais divulgado em ensaios farmacológicos e clínicos é o método baseado na aplicação periférica de formol (Duboisson and Dennis, 1977). A injecção subcutânea de formol diluído produz uma resposta dolorosa bifásica, caracterizada por uma breve fase de dor intensa, que ocorre nos primeiros cinco minutos após injecção (Dickenson and Sullivan, 1987b; Haley et al., 1990; Puig and Sorkin, 1996; McCall et al., 1996; Martindale et al., 2001) e por uma fase de dor moderada, que ocorre entre os 20 e 60 minutos após injecção (Duboisson and Dennis, 1977; Coderre et al., 1990; Tjølsen et al., 1992; Dallel et al., 1995). A resposta dolorosa pode ser quantificada comportamentalmente ou através de um aumento bifásico da actividade dos neurónios da medula espinhal (Dickenson and Sullivan, 1987b).

1.4.2. MODELO DE DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA

O maior avanço no estudo de patologias associadas à dor neuropática foi dado por Wall e colaboradores nos anos 70 através da descoberta de que a lesão de nervos periféricos pode gerar mecanismos pato-fisiológicos diferentes dos gerados por estímulos agudos nôxicos (Wall and Gutnick, 1974). Esta premissa foi o ponto de partida para o desenvolvimento de modelos animais baseados na lesão periférica de nervos. Os primeiros

modelos eram baseados no seccionamento do maior nervo periférico, usualmente o nervo ciático, que acompanhado da lesão do nervo safeno produzia uma desnervação completa da zona distal da pata do rato (Wall et al., 1979). O objectivo deste modelo era estudar a dor na ausência de qualquer percepção de informação sensorial associada à área da lesão. Contudo, uma das dificuldades associadas a esta técnica era a impossibilidade de quantificar as respostas espontâneas associadas à aplicação de estímulos.

Nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidos alguns esforços para a implementação de modelos de lesão parcial dos nervos. Um dos mais conhecidos envolve a constrição do nervo ciático utilizando quatro anéis de suturas em torno do nervo sem o estrangular. Esta técnica foi desenhada para produzir danos a apenas alguns axónios do nervo ciático (Bennett and Xie, 1988). Outro modelo, baseado no mesmo conceito utilizava um nó com estrangulação em torno de metade da parte proximal do nervo ciático (Seltzer et al., 1990). Todavia, em ambos casos o grau de dano não apresenta reprodutibilidade, existindo alguma variabilidade de respostas entre animais. Uma alternativa foi a desenvolvida por Chung e colaboradores (1992) utilizando o estrangular de duas raízes dos nervos espinhais, o L5 e L6, perto da via dorsal ganglionar deixando a componente L4 do nervo ciático intacta, assim como o nervo safeno (via L3) (Kim and Chung, 1992). Este modelo possibilitou o teste de comportamentos em dermatomas da pata intactos. Por outro lado, apresenta a desvantagem do risco de dano ou exposição do nervo espinhal L4 à inflamação devido à sua proximidade do segmento do nervo espinhal em L5. Estes três modelos (modelo de ligação parcial do nervo ciático de Seltzer, modelo por constrição crónica de Bennett e modelo de ligação de nervo espinhal de Chung) foram utilizados extensamente no estudo de diversos comportamentos, respostas farmacológicas e indução de alterações no sistema somato-sensitivo, continuando ainda hoje a ser

importantes ferramentas no estudo do processamento doloroso de cariz neuropático (Dubner and Ruda, 1992; Bennett, 1994).

Mais recentemente, Decosterd e Woolf (2000) desenvolveram um modelo de dor neuropática baseado numa desnervação parcial. Este modelo é tecnicamente mais fácil de executar do que os anteriores, apresentando de animal para animal um baixo grau de variabilidade em relação ao dano produzido. Neste modelo é privilegiada a possibilidade de estudar o contributo relativo dos neurónios sensoriais primários com lesão e dos neurónios sensoriais da vizinhança intactos na patofisiologia da dor. A ideia essencial recai na possibilidade de observar as alterações induzidas se dois dos três terminais distais dos ramos do nervo ciático são axotomizados (o nervo tibial e peroneal comum) separando um (o nervo sural). A este modelo foi dada a designação de “*spared nerve injury*” (SNI), inicialmente foi concebido para a aplicação no rato, mais tarde foi também adaptado para ratinho (Bourquin et al., 2006). O modelo de dor SNI provou ser robusto, com alterações de sensibilidade nas respostas à estimulação mecânica e térmica substanciais e prolongadas, simulando de uma forma muito próxima os sintomas observados na dor neuropática clínica.

1.5. A DOR E OS ESTADOS COMPORTAMENTAIS NEURONIAIS DO RITMO CIRCADIANO

A actividade eléctrica talâmica e cortical reflecte os diferentes estados comportamentais inseridos no ciclo de vigília/sono dos vertebrados (ritmo circadiano). Durante o estado de vigília, as regiões tálamo-corticais produzem oscilações rápidas de baixa amplitude (bandas de frequência *beta* e *gamma*, >15 Hz) (Steriade et al., 1993; Destexhe et al., 1999). Em contraste, durante a entrada no período de sono são visíveis

oscilações lentas de alta amplitude em diferentes bandas de frequência (ondas *delta* 1-4 Hz e “*spindles*” a 7-14 Hz) (Steriade et al., 1993; Achermann and Borbély, 1997; Destexhe et al., 1999), caracterizando um estado denominado por *slow-wave-sleep* (SWS). Este estado é seguido por um estado intermédio de transição (TS) caracterizado por oscilações elevadas (Mandile et al., 1996; Piscopo et al., 2001a). Durante o estado de “*rapid-eye-movement*” (REM), o córtex apresenta oscilações rápidas de baixa amplitude, similares às observadas no estado de vigília (Vanderwolf, 1969; Steriade et al., 1993). Nos roedores, o estado de sono REM é também caracterizado pela ocorrência de oscilações *theta* (4-9 Hz) no hipocampo (Vanderwolf, 1969) muito próximas das observadas no padrão de alerta do estado de vigília (Winson, 1974). Existe ainda um estado de vigília caracterizado pelo movimento sincronizado dos bigodes do rato (*whisker-twitching*, WT) e por oscilações nos potenciais de campo locais (LFPs) tálamo-corticais na banda de frequência 7-12 Hz (Nicolelis et al., 1995; Fanselow and Nicolelis, 1999). Estas oscilações foram recentemente associadas a um estado fisiológico de percepção da informação sensorial (Fanselow and Nicolelis, 1999; Nicolelis and Fanselow, 2002a; 2002b; Wiest and Nicolelis, 2003).

Na literatura encontram-se diversos estudos que abordam a interacção entre a dor e as perturbações no ciclo circadiano, tanto em humanos (Moldofsky and Scarisbrick, 1976; Lentz et al., 1999; Means et al., 2000; Porreca et al., 2002; Lautenbacher et al., 2006) como em modelos animais (Carli et al., 1987; Landis et al., 1988; Onen et al., 2001; Andersen and Tufik, 2003; Kontinen et al., 2003; Mendelson et al., 2003; Monassi et al., 2003; Schütz and Tufik, 2003; Keay et al., 2004; Millecamps et al., 2005). Estudos clínicos em humanos revelaram que o nível de sensibilidade à dor aumenta em patologias associadas à privação do sono (Moldofsky and Scarisbrick, 1976; Drewes et al., 1998; Lentz et al., 1999; Kundermann et al., 2004a; 2004b; Lautenbacher et al., 2006). Estudos em modelos animais ilustram o envolvimento da privação do estado REM na diminuição do limiar

necessário para a percepção de dor (Hicks and Sawrey, 1978; Onen et al., 2001; Wei et al., 2007).

1.6. OBJECTIVOS DO TRABALHO E ABORDAGEM TÉCNICA

O trabalho utilizou como animal de experiência o Rato, espécie que tem demonstrado ser particularmente adequada para utilização em testes comportamentais para o estudo da dor. A parte experimental compreende dois trabalhos referentes a dois aspectos distintos, que se apresentam sequenciados em função da lógica de articulação dos resultados.

O primeiro trabalho avalia os padrões de actividade neuronal tálamo-cortical associados a comportamentos específicos, como sejam as contrações musculares espontâneas da pata do rato decorrentes da injecção periférica de formol (Modelo I). Este tipo de manifestações comportamentais têm sido correlacionadas com oscilações do nível de dor, nomeadamente com a ocorrência de picos espontâneos de dor. Partindo desse pressuposto pretendeu-se estudar os padrões de actividade neuronal na janela temporal de execução desse tipo de contrações.

O segundo trabalho diz respeito ao estudo das alterações induzidas com a instalação de uma condição de dor crónica neuropática periférica a nível dos estados comportamentais neuronais envolvidos na estrutura do ritmo circadiano do rato (Modelo II). Para este objectivo foi aplicado um modelo de dor que apresenta a vantagem de ser baseado na neuropatia do nervo ciático, sendo por isso ideal para a transposição e comparação com dados clínicos. Com este modelo pretendeu-se realizar registos neuronais de longa-duração possibilitando a análise das alterações decorrentes da evolução de uma condição de dor crónica a nível da estrutura do ritmo circadiano do rato.

Capítulo I – Introdução

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neurais

Capítulo II – Metodologia

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

II - METODOLOGIA

2.1. MODELO ANIMAL

Para modelo animal foram utilizados ratos albinos da estirpe *Sprague-Dawley* (Charles River, Barcelona, Espanha) com peso oscilando entre 350 e 450 g. Os animais foram mantidos num ciclo de 12 horas diurno/nocturno, a uma temperatura constante de $21\pm2^{\circ}\text{C}$ e humidade relativa entre 50 e 70%. As sessões de habituação dos animais decorreram diariamente à mesma hora durante o período diurno. Os ratos foram mantidos num regime *ad libitum* com acesso livre a água e comida. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as linhas éticas para experimentação animal impostas pela directiva da Comunidade Europeia número 86/609/ECC de 24 de Novembro de 1986 e pelas directrizes éticas para experimentação de dor em modelos animais (Zimmermann, 1983).

2.2. MICROCIRURGIA

Os animais foram anestesiados com uma injecção intramuscular (IM) de xilazina e quetamina (10 e 60 mg/kg, respectivamente). O nível de anestesia foi mantido com injecções IM de 1/3 de dose inicial de cetamina. O nível de anestesia e paralise muscular foi avaliado regularmente testando o piscar da córnea e reflexos das patas posteriores por pressão com pinça cirúrgica. Após a indução da anestesia foi administrada a cada animal uma dose de sulfato de atropina (0.02 mg/kg, subcutâneo (SC)) e a cada hora 1 ml de soro (sacarose 2% p/v em NaCl 0.9% p/v, SC) durante a cirurgia.

A temperatura corporal do animal foi quantificada com um termómetro rectal e mantido a 37°C através de um sistema com uma manta homeotérmica. Na região da incisão cirúrgica foi removido o pelo e feita a esterilização da pele com três aplicações de álcool a 70% v/v e Betadine. Os animais anestesiados foram fixados num aparelho de estereotáxia com barras auriculares e realizada uma incisão rostro-caudal (RC) em relação aos olhos e orelhas do animal. O tecido conectivo foi dissociado do osso craniano expondo a superfície do crânio que foi limpa com peróxido de hidrogénio. Depois do osso craniano estar exposto foram realizados orifícios no crânio, para colocação de 4 a 5 micro-parafusos e para a colocação das matrizes de micro-eléctrodos (área, 3x3 mm). Os micro-parafusos foram utilizados para sustentação das matrizes e utilizados como referência externa dos micro-eléctrodos. Para evitar efeitos de desidratação durante o processo cirúrgico, a superfície do osso craniano foi coberta com óleo mineral.

Antes da implantação, os micro-eléctrodos foram mergulhados numa solução saturada de sacarose e cortados até ao comprimento ideal utilizando uma tesoura com secção de corte em tungsténio e carbono. Após este processo, as matrizes foram montadas num micro-posicionador hidráulico (Microdrive, FHC) para sua introdução no cérebro após a remoção da membrana *dura mater* a uma velocidade máxima de 100 µm/min.

Cada matriz de micro-eléctrodos foi construída com 8 filamentos de tungsténio isolados com uma resina “Isonel” (35 µm de diâmetro, Califórnia Fine Wire company, Grover Beach, Califórnia, USA), com impedâncias variando entre os 0.5 e 0.7 MΩ a 1 KHz. As matrizes de micro-eléctrodos foram construídas com uma arquitectura em 4x2 (Figura 2.2.1.), com um espaçamento dos eléctrodos de 250 µm entre linhas e 450 µm entre colunas.

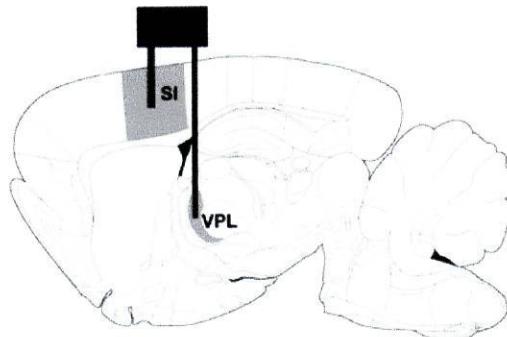
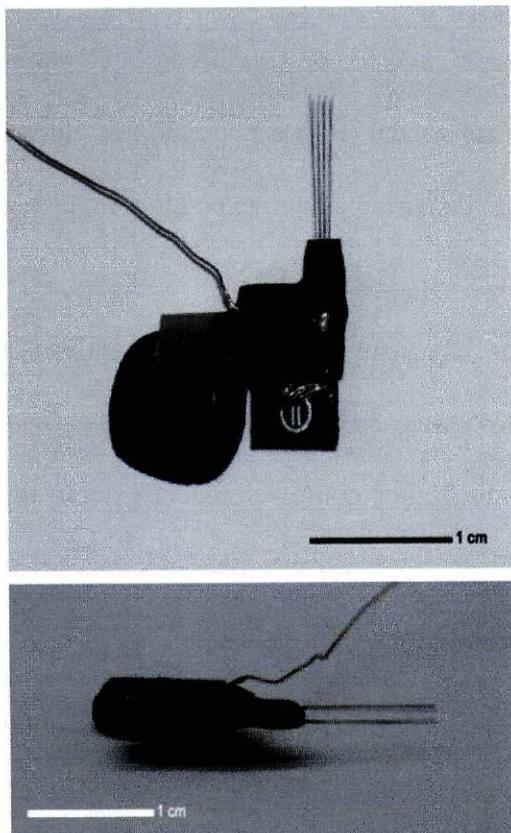


Figura 2.2.1. – Matriz de micro-eléctrodos com arquitectura em 4x2 e espaçamento fixo entre filamentos. Imagem superior ilustrando o alinhamento dos filamentos em linha (250 μm de espaçamento entre filamentos) e imagem inferior ilustrando o espaçamento entre cada coluna de filamentos (450 μm). Corte sagital ilustrando a colocação das matrizes de eléctrodos a nível do córtex somato-sensitivo primário (SI) e núcleo talâmico ventro-posterior-lateral (VPL).

As coordenadas de implantação utilizaram como referência o Atlas do cérebro do rato (Paxinos and Watson, 1998). As seguintes coordenadas relativas ao *bregma* em milímetros foram utilizadas para centrar as matrizes de micro-eléctrodos nas regiões de implantação: **SI** (-2.5 rostro-caudal [RC], +2.5 medio-lateral [ML], -1.6 dorso-ventral [DV]) e **VPL** (-3.1 RC, +3.2 ML, -6.4 DV).

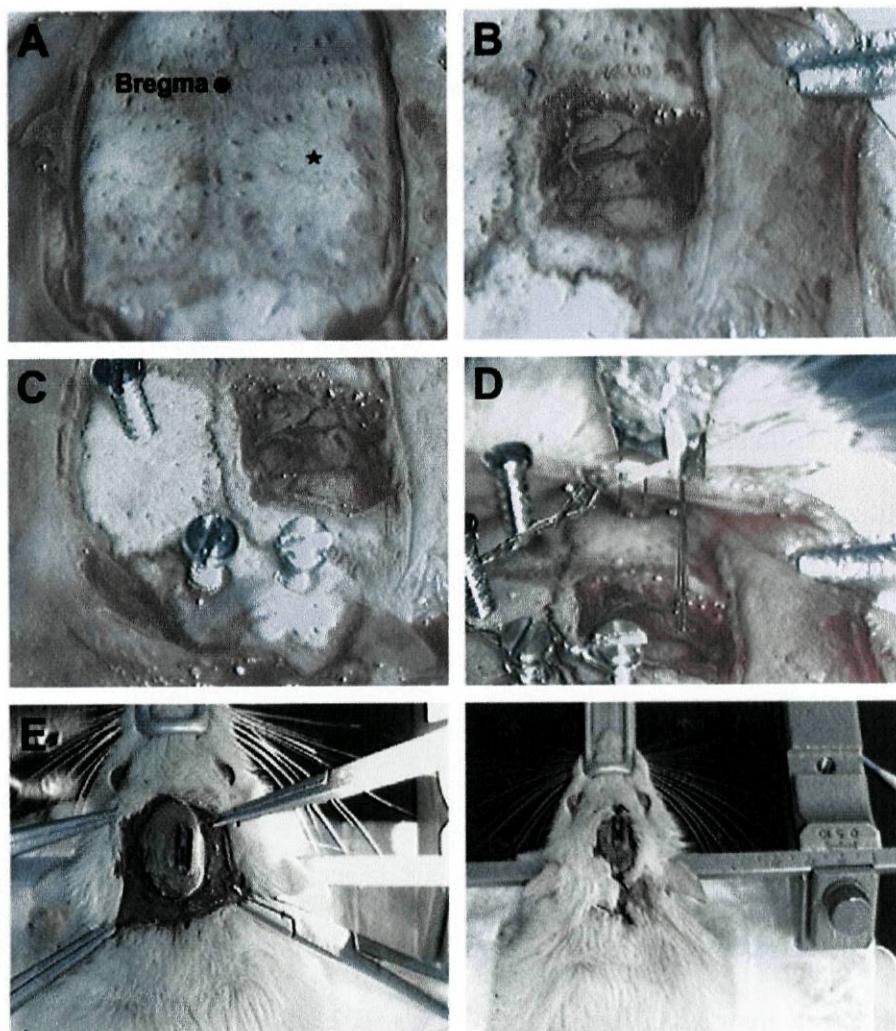


Figura 2.2.2. – Principais etapas do processo de implantação das matrizes de micro-eléctrodos. (A) Exposição da superfície do osso craniano e localização do ponto craniano *Bregma*, a partir do qual foram calculadas coordenadas de deslocamento para a implantação. (B, C) Área de osso removida para a penetração das matrizes de micro-eléctrodos, micro-parafusos para sustentação óssea do implante. (D) Matriz dupla de micro-eléctrodos colocada num micro-posicionador utilizado para promover o seu deslocamento até às regiões de interesse do córtex SI e núcleo talâmico VPL. Posicionamento da referência externa em prata da matriz dupla de micro-eléctrodos em torno dos micro-parafusos. (E,F) Cimento dental para sustentação do implante, suturação dos tecidos na periferia do implante.

Depois dos micro-eléctrodos estarem na posição correcta, a craniotomia foi selada com cimento dental acrílico (Nicolelis et al., 1997; Cardoso-Cruz et al., 2006b). No final da implantação, o animal foi transferido para uma caixa de recobro. A cada animal foi administrado um analgésico, Rimadyl (caprofeno, 5-10 mg/kg, SC cada 24 horas) e um

antibiótico Clamoxyl (amoxicilina, 6 mg/kg, SC cada 24 horas) durante um período de 3 dias após cirurgia. Os ratos foram sujeitos a uma semana de recobro pós-cirúrgico antes de iniciarem as sessões para registo da actividade neuronal.

2.3. REGISTOS NEURONIAIS

A actividade neuronal registada através dos micro-eléctrodos implantados foi processada utilizando o sistema *Multineuron Acquisition Processor* (16-MAP, Plexon Inc, Dallas, TX, USA). Através de cada eléctrodo foram registados em paralelo potenciais de acção de neurónios e potenciais de campo locais (LFPs). A sua separação foi realizada aplicando dois filtros diferentes. Os potenciais de acção foram pré-amplificados entre 10000-25000X e digitalizados a 40 KHz. Foram utilizadas janelas voltagem em função de tempo para a identificação das curvas dos potenciais de acção de cada neurónio. Através de cada canal foram registados entre 1 a 4 potenciais de acção diferentes, a sua selecção foi feita em *online* (SortClient 2002, Plexon Inc., Dallas, TX, USA) e validada por análise em *offline* (Offline Sorter 2.8., Plexon Inc., Dallas, TX, USA) de acordo com os seguintes critérios acumulativos: limiar de voltagem superior a dois desvios padrão da amplitude das distribuições, uma razão sinal/ruído superior a 2.5 (verificada através do monitor de um osciloscópio digital), ocorrência de potenciais de acção em percentagem inferior a 1% em intervalos inferiores a 1.2 msec, topologia das curvas dos potenciais de acção através aplicação de um algoritmo baseado no *template* das mesmas e análise das componentes principais. Os LFPs foram pré-amplificados 500X e filtrados (0.5-400 Hz). Os sinais foram conduzidos ao sistema de registo MAP através de uma placa NIDAQ (National Instruments, TX, USA) e digitalizados a 500 Hz.

Os dados obtidos a partir dos registos neuronais foram processados em offline utilizando várias representações gráficas, estatísticas e pacotes de análise numérica. O primeiro nível de análise envolveu a produção de histogramas de actividade de neurónios e espectrogramas de LFPs. Os dados foram processados e analisados no programa NeuroExplorer (Versão 3, Plexon Inc, Dallas, TX, USA) e exportados para análises complementares para MatLab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA).

2.4. ANÁLISE DE COMPORTAMENTO

Durante o período prévio ao início da cada experiência, os animais foram individualmente habituados à câmara de registo (45x45 cm). Foram realizadas 5 sessões de habituação com duração de 90 minutos em dias diferentes não consecutivos. No decorrer das experiências, os animais estavam acordados e podiam mover-se livremente pela câmara de registo. O comportamento foi registado em vídeo utilizando o sistema CinePlex (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) composto por uma câmara digital firewire (30 frames/seg). Este sistema utiliza um temporizador que possibilita a sincronização dos potenciais de acção e LFPs com o registo de vídeo. Durante cada sessão de registo comportamental foi utilizado um gerador de áudio de ruído branco (50-20000 Hz) instalado na câmara de registo comportamental. Este sistema foi utilizado para evitar a perturbação dos animais por estímulos externos à câmara de registo.

2.4.1. MODELO I – DOR INFLAMATÓRIA

Para cada animal foi realizada uma sessão de registo com duração total de duas horas divididas por um período de controlo (primeira hora, pré-injecção de formol) e por um período de estimulação (segunda hora, pós-injecção de formol). A injecção subcutânea

de 50 µl a 2.5% (v/v) de formol (diluição 1:40 de formaldeído a 37% (formol) em NaCl 0.9% (p/v)) (McCall et al., 1996) foi efectuada na face dorsal da pata posterior do animal, consoante o protocolo contralateral ou ipsilateral em causa (Figura 2.4.1.).

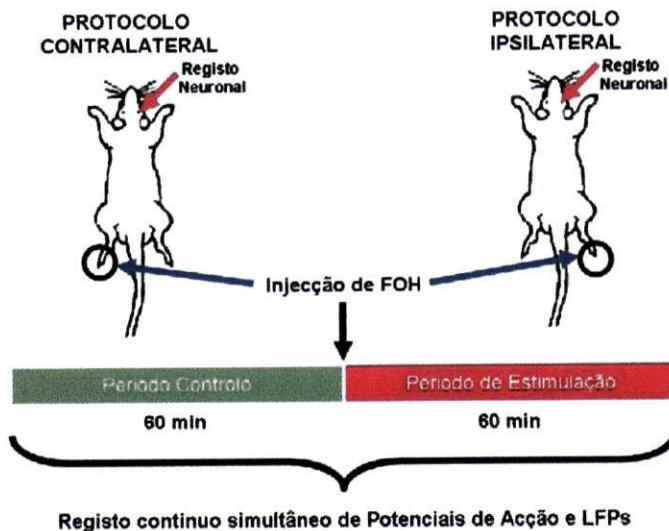


Figura 2.4.1. Protocolos de experimentais para o modelo de dor inflamatória por injeccão periférica de formol. Período de registo neuronal continuo, dividido em período de controlo (área a verde) e período de estimulação (área a vermelho) após injeccão de formol. Parte superior ilustrando os dois protocolos de injeccão implementados, contralateral e ipsilateral ao hemisfério cerebral de registo.

Os registos de vídeo associados à actividade neuronal foram utilizados para a selecção dos tempos iniciais das contrações musculares espontâneas da pata injectada.

2.4.1.1. ALGORITMO PARA A DETECÇÃO DE OSCILAÇÕES NOS SINAIS DE LFP TÁLAMO-CORTICAIAS

O sinal dos LFPs tálamo-corticais é caracterizado por um aumento da densidade espectral de potência na banda 4-9 Hz durante o período que precede cada contração muscular. A função `FindContra.m` (Anexo A.2.) implementada em MatLab foi desenhada com o objectivo de detectar de forma automática o tempo de ocorrência das contrações

musculares espontâneas da pata do rato injectada, baseando-se nas oscilações do sinal dos LFPs tálamo-corticais. Esta função apresenta três características baseadas neste padrão:

- (1) Permite detectar o tempo dos picos associados aos aumentos da densidade espectral de potência do sinal dentro da banda de frequência *theta* (4-9 Hz), durante o período que precede a ocorrência de cada contração muscular;
- (2) Permite comparar os tempos dos picos em causa com o tempo real em vídeo de cada contração;
- (3) Permite estabelecer uma tabela de acertos entre a procura do algoritmo e as contrações musculares seleccionadas em vídeo.

Para cada canal de LFPs foi construído o respectivo histograma de densidade espectral de potência (PSDs) limitado à banda 4-9 Hz e encontrado o valor máximo da potência (dB) para cada janela de 50 mseg (aplicando uma FFT com comprimento de 1024 pontos, 20 pontos por intervalo de tempo) (*GUISpecgram*, Anexo A.1.). Estes valores foram utilizados para a construção de uma matriz, na qual foram representados os valores máximos ($P_{max,i}$) por intervalo em função do tempo. Para cada intervalo de tempo foi calculado o $|Log_2(P_{max,i})|$. Foi estabelecido um limite de detecção de eventos para o algoritmo. Assim, se o valor de $P_{max,i}$ determinado para cada intervalo de tempo for 2.5x superior ao $|Log_2 (P_{max,total} \text{ do sinal para o tempo total})|$, considerou-se a possível existência de uma contração muscular da pata injectada no intervalo de tempo analisado. Os dados resultantes dessa procura foram utilizados para a elaboração de uma matriz binária com resolução temporal de 50 mseg.

Na terceira parte, o algoritmo realiza uma comparação entre o tempo dos eventos encontrados e o tempo real de ocorrência das contrações musculares no registo de vídeo.

Nesta tarefa, o algoritmo compara o tempo do primeiro *frame* em vídeo correspondente ao início de cada contração e os eventos seleccionados no ponto anterior. Esta comparação foi realizada utilizando uma janela temporal de [-250, 0] msec em relação ao tempo do *frame*. Esta janela foi optimizada atendendo ao facto das oscilações da densidade espectral de potência do sinal neuronal precederem a execução da contração muscular da pata. Foi considerado um evento verdadeiro por parte do algoritmo, se dentro dessa janela for encontrado um evento seleccionado no sinal. Esta comparação permite aferir a eficácia do algoritmo, avaliando a percentagem de êxito na detecção dos tempos das contrações reais observadas em vídeo.

Para proceder à descriminação do tipo de eventos seleccionados foi utilizada a seguinte classificação: as contrações musculares observadas em vídeo foram classificadas como *eventos observados* (OE); todos os picos encontrados pelo algoritmo na banda de frequência 4-9 Hz como *eventos falsos - positivos* (FPE); e como *eventos verdadeiros - positivos* (TPE) todos os eventos do tipo FPE que cumprem o critério de êxito apresentado anteriormente.

2.4.2. MODELO II – DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA

O modelo de dor neuropática por lesão do nervo periférico (*spared nerve injury*, SNI) (Decosterd and Wolf, 2000) comprehende uma axotomia e uma ligação dos nervos tibial e peroneais comuns, deixando o nervo sural intacto. A Figura 2.4.2.A. ilustra a parte anatómica associada à região de implementação da lesão.

Para proceder à implementação do modelo de dor, os animais foram previamente anestesiados com uma mistura de xilazina/cetamina (10 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente). Os nervos periféricos foram expostos e o nervo peroneal comum e tibial

ligados com linha de sutura cirúrgica não absorvível. A parte distal à ligação foi seccionada, removendo 2 a 4 mm da cápsula distal do nervo. Durante este processo todos os cuidados foram tomados para evitar qualquer contacto ou estiramento do nervo sural intacto. No final da cirurgia, o músculo e a pele da região de incisão foram suturados em duas camadas.

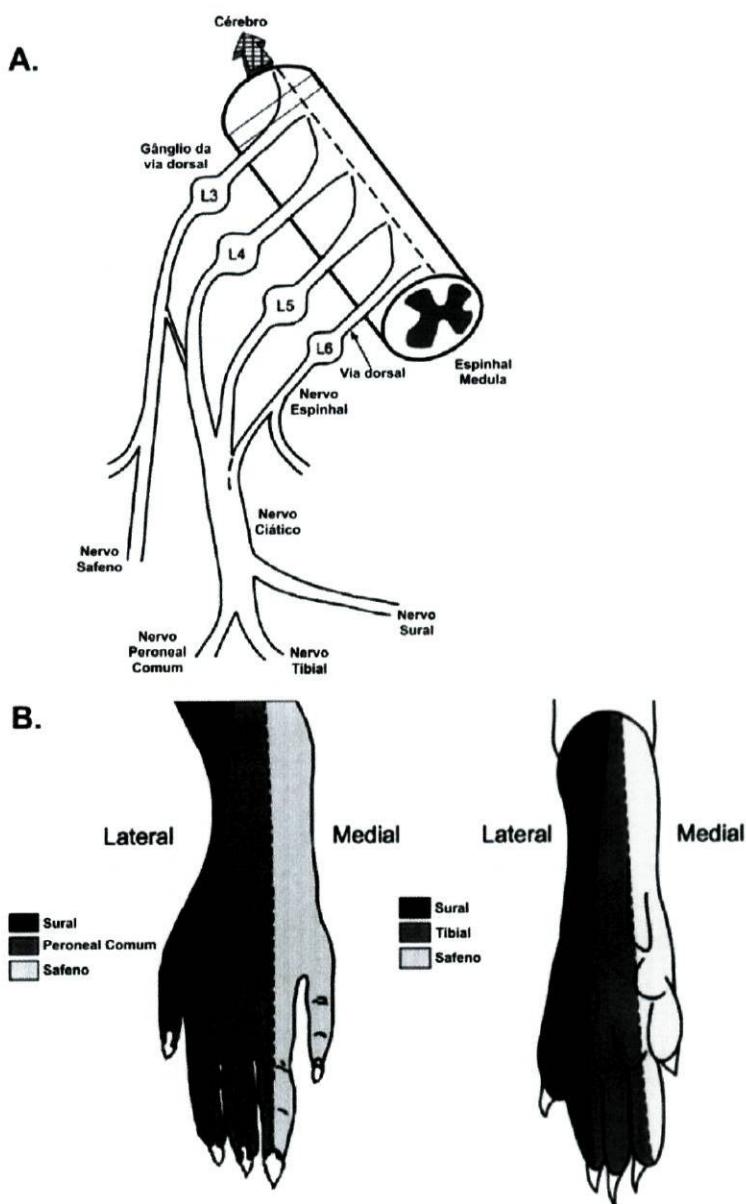


Figura 2.4.2. (A) Diagrama dos nervos ciático e safeno representado os seus ramos terminais e origem na via dorsal. O plexo do nervo safeno (L3 DRG) apresenta uma sobreposição pequena com o plexo do nervo ciático (L4, 5 e 6 DRGs). (B) Zonas da parte dorsal e plantar da pata do rato enervadas pelos ramos terminais do nervo ciático e nervo safeno. Adaptado de Decosterd and Woolf, 2000.

Os registos neuronais para este modelo foram repartidos por 4 sessões, com uma duração total cada de 24 horas, abrangendo um ciclo circadiano completo do rato (12/12 horas fase diurna e nocturna). O regime de luz na câmara de registo foi regulado por um temporizador. Foram realizadas duas sessões de registo contínuo durante o período de controlo (pré cirurgia SNI) e duas durante o período de estimulação (pós cirurgia SNI) (Figura 2.4.2.C). No decorrer das sessões de registo, os ratos tiveram acesso livre a água e comida, podendo igualmente mover-se livremente pela câmara de registo (45x45 cm).

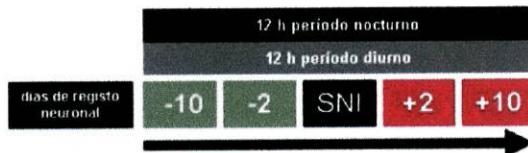


Figura 2.4.2.C. - Protocolo experimental para o modelo de dor neuropática por lesão periférica do nervo. Período de registo neuronal continuo, dividido em duas sessões de registo neuronal no período de controlo (área a verde) e duas no período de estimulação (área a vermelho) após cirurgia de SNI. Cada sessão de registo contemplou um ciclo circadiano do rato.

No final de cada sessão de registo, o nível de dor foi avaliado através de uma série ascendente de monofilamentos de *von Frey*. Durante essa avaliação, os animais foram colocados num corredor elevado com o piso composto por uma rede metálica possibilitando a estimulação. Foi avaliada a superfície plantar medial e lateral da pata do rato subjacente à implementação do modelo de dor (Figura 2.4.2.B.). Esta quantificação foi efectuada durante o período controlo e estimulação. Os resultados são apresentados em média ± erro padrão da média (σ/\sqrt{n}). A existência de diferenças significativas foi avaliada

por *one-way ANOVA* não paramétrico do tipo Wilcoxon. Foi considerada a existência de significância para valores de probabilidade <0.05.

2.4.2.1. ANÁLISE DAS TRANSIÇÕES COMPORTAMENTAIS

Numa primeira análise, os estados de comportamento foram identificados pela inspecção em registo de vídeo e respectivo sinal de LFPs, tendo sido classificados quatro estados comportamentais (Fanselow and Nicolelis, 1999). O estado denominado por *waking state* (WK), o qual pode ser subdividido em estado de *active exploration* (AE) e estado *quiet waking* (QW). Em *active exploration* (AE) o rato está envolvido em comportamentos exploratórios (locomoção, oscilação dos bigodes e cheirar), com uma baixa amplitude cortical dos LFPs e densidade espectral de potência na banda *theta* (θ, 4-9 Hz) e *gamma* (γ, 30-55 Hz). Em *quiet waking* (QW) o rato está imóvel (sentado ou quieto) ou realizando comportamentos automáticos estereotipados (comer, beber, lamber ou bocejar), com baixa amplitude cortical dos LFPs e actividade elevada nas bandas *theta* e *gamma*, embora inferior ao estado AE. No estado *whisker-twitching* (WT) o rato está imóvel, movendo de forma rítmica os bigodes (*twitching*) na mesma frequência das oscilações cortico-talâmicas (7-12 Hz) (Fanselow and Nicolelis, 1999). No estado *slow-wave-sleep* (SWS) o rato permanece imóvel com os olhos fechados e movimentos respiratórios lentos e regulares. Este estado começa com oscilações na banda 10-14 Hz sobrepostas com ondas do tipo *delta* (δ, 1-4 Hz). Neste estado à medida que o rato entra num estado mais profundo as oscilações *delta* tornam-se predominantes, no entanto podem ser observados picos isolados em banda *gamma*. No estado de *rapid-eye-movement* (REM) o animal encontra-se numa posição imóvel e atônito, isoladamente podem ser também

observados movimentos dos bigodes e orelhas. Sendo caracterizado por sinais de LFPs corticais de baixa amplitude e uma elevada potência na banda *theta* e *gamma*.

Para além dos estados anteriormente referenciados, a metodologia de processamento de sinal proposta por Gervasoni et al. (2004) incorpora mais dois, o estado “M” e o estado “U”. No estado “M” estão incluídos todos os movimentos do rato que não apresentam um padrão espectral específico. Por outro lado, como estado “U” são classificadas todas as oscilações não específicas ocasionais que mediam as transições entre estados comportamentais, sendo caracterizado por uma mistura de ondas *theta* (θ , 4-9 Hz) e *alpha* (α , 9-15 Hz) sobrepostas com ondas do tipo *delta* (δ , 1-4 Hz).

De acordo com estudos publicados, o rato passa aproximadamente 60% do período diurno (com luz) em sono e 60% do período nocturno (sem luz) acordado (Mandile et al., 1996; Piscopo et al., 2001a).

2.4.2.2. CONSTRUÇÃO DO MAPA 2-D DE ESTADOS COMPORTAMENTAIS

Para analisar a dinâmica dos estados espontâneos do cérebro e suas transições foi definido um mapa de estados a duas dimensões (2-D), através da razão de duas amplitudes espectrais (Figura 2.4.2.2.A.), seguindo a análise proposta por Gervasoni et al. (2004) e Lin et al. (2006). Esta razão foi calculada pela divisão das amplitudes espectrais integradas na banda de frequência dos LFPs seleccionada, simultaneamente registada nas duas áreas de interesse (córtex SI e núcleo talâmico VPL).

Primeiro, todos os segmentos de sinal com amplitude de saturação foram descartados nos registos (0.77-1.13% por rato). Em MatLab, foi aplicada janela de transformada de Fourier com comprimento de 1024 pontos a cada sinal de LFPs. Para tal,

foi utilizada uma janela com comprimento de 2 seg. e salto de 1 seg. Os parâmetros da transformada de Fourier foram seleccionados para uma frequência de resolução de 0.5 Hz. As duas razões de amplitude espectral foram calculadas integrando a amplitude espectral (valor absoluto) em função das bandas de frequência seleccionadas em cada janela de registo, de acordo o seguinte postulado: 0.5-20/0.5-55 Hz para a razão 1 e 0.5-4.5/0.5-9 Hz para a razão 2. Estas razões são heurísticas que resultam da procura de parâmetros optimizados para a melhor separação dos dados neuronais. A razão de quantificação foi desenhada para produzir valores normalizados entre 0 e 1. A gama de frequência do numerador foi sempre incluída no denominador para a obtenção de distribuições mais simétricas.

Na filtragem dos dados foi aplicada uma frequência de corte baixo de 0.5 Hz com o objectivo de eliminar a componente DC. A cada rato, foi aplicada uma análise de componentes principais (PCA) dentro da mesma razão de amplitude espectral obtida a partir de todos os canais de LFPs. A PCA foi utilizada como a razão de quantificação, explicando cerca de 80% da variância. Aos valores resultantes das PCs foi aplicada uma janela de *Hanning* de 20 segundos de comprimento para reduzir a variabilidade dentro de cada estado no mapa 2-D. No qual, cada ponto representa 1 seg. da actividade do cérebro. A densidade de pontos reflecte a abundância relativa dos diferentes estados do cérebro e a distância entre dois pontos consecutivos a velocidade das alterações espetrais.

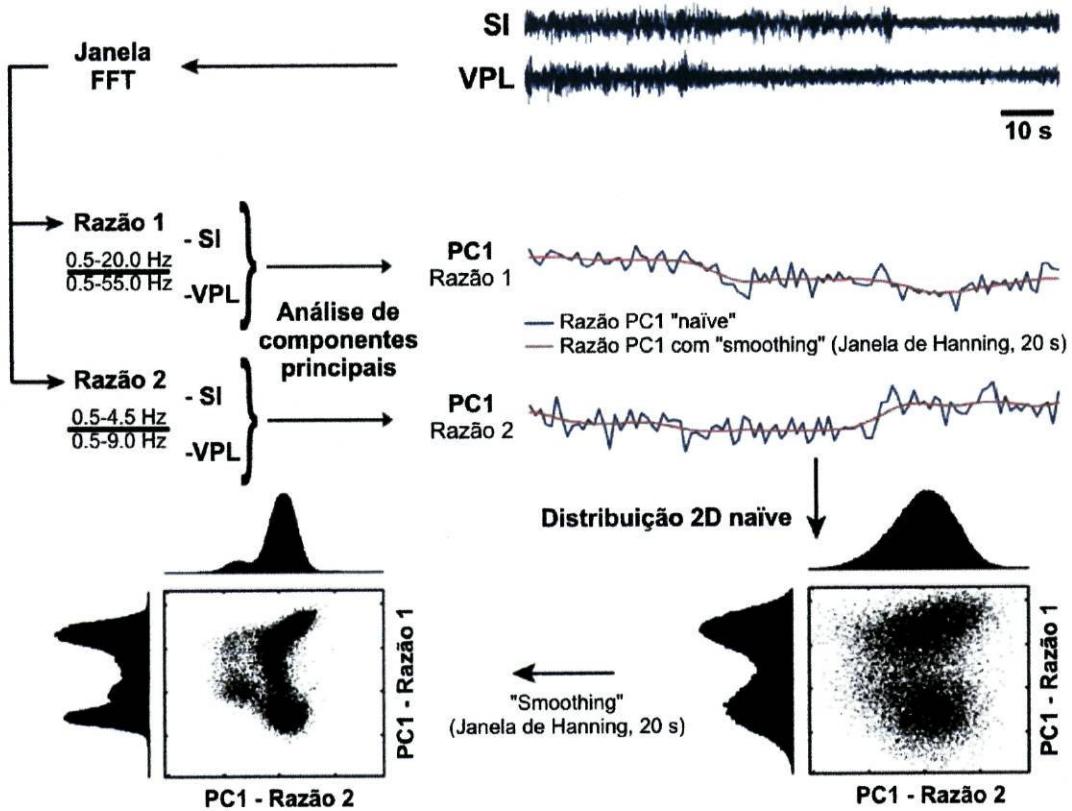


Figura 2.4.2.2.A. – Construção do mapa 2-D de estados. Após a eliminação dos segmentos de sinal com amplitude de saturação (0.77-1.13% do total registado por rato) a cada sinal de LFP foi aplicada uma janela de transformada de Fourier para calcular as duas razões de amplitude espectral. A essas razões obtidas a partir de todos os canais de LFPs é aplicada uma análise de componentes principais (PCA), sendo utilizada a PC1 como a razão de medição global. Essas razões de medição obtidas para cada segundo de registo são posteriormente moldadas com uma janela de Hanning de 20 s de comprimento. As duas componentes principais das razões espetrais são representadas graficamente uma em função da outra representando o mapa 2-D de estados. Adaptado de Gervasoni et al. (2004).

2.5. ANÁLISE DE DADOS

Os dados obtidos a partir dos registos neuroniais foram processados em *offline* utilizando várias representações gráficas, estatísticas e pacotes de análise numérica. O primeiro nível de análise envolveu a produção de histogramas de actividade de neurónios e spectrogramas de LFPs, os quais foram utilizados para a definição espaço-temporal de

Capítulo II – Metodologia

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

neurónios individuais e actividade por área de registo. Os dados foram processados e analisados no programa NeuroExplorer (Versão 3, Plexon Inc, Dallas, TX, USA) e exportados para MatLab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA).

Adicionalmente, foram implementadas quatro funções em MatLab: “*GUISpecgram.m*” (Anexo A.1.), aplicada na construção de histogramas de densidade espectral de potência (PSD) e espectrogramas de LFPs; “*FindContra.m*” (Anexo A.2.), algoritmo desenhado para a procura de oscilações na banda 4-9 Hz de LFPs associados a contrações musculares da pata (modelo I de dor); “*StatHypnoALL.m*” (Anexo A.3.), aplicado no cálculo do tempo total dispensado por registo em cada estado comportamental (modelo II de dor); e “*States.m*” (Anexo A.4.), aplicado na análise do número de transições entre cada estado de comportamento (modelo II de dor). As funções para processamento de sinal e construção do mapa de estados comportamentais aplicadas no modelo II de dor foram gentilmente cedidas por Damien Gervasoni (*gervasoni@neuro.duke.edu*) e Shih-Chieh Lin (*sclin@neuro.duke.edu*) e adaptadas para as características do nosso sinal.

2.6. HISTOLOGIA

No final de cada experiência, os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina/xilazina e o local de registo marcado mediante a injeção de corrente (10-20 µA durante 10-20 s) através de um dos micro-eléctrodos de cada matriz. Este passo teve como objectivo assinalar a área na periférica dos micro-eléctrodos de registo. Após este passo, os animais foram perfundidos através do coração com 0.01 M de tampão de fosfato (pH=7.2) em solução salina 0.9% e solução de paraformaldeído a 4%. O cérebro foi removido e fixado em solução de paraformaldeído a 4% durante 4 horas e transferido para solução de

Capítulo II – Metodologia

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

sacarose a 30% (p/v) antes de se proceder ao congelamento e seccionamento em fatias de 60 µm. As fatias foram coradas com violeta de cresil para identificação do local de registo ao microscópio. Esta técnica, em conjugação com a anotação cuidadosa do movimento dos eléctrodos durante o período de implantação foi utilizada para a localização do local de registo.

Capítulo III – Resultados

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

III – RESULTADOS

3.1. MODELO I - DOR INFLAMATÓRIA

3.1.1. COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS ASSOCIADOS À APLICAÇÃO PERIFÉRICA DE FORMOL

A injecção intra-plantar de formol induz uma resposta nociceptiva caracterizada por duas fases distintas que podem ser identificadas mediante a análise de comportamentos padrão do rato subjacentes ao modelo de dor (Coderre et al., 1993; Duboisson and Dennis, 1977). Um tipo de resposta comportamental clássica são as contrações musculares espontâneas da pata injectada (Figura 3.1.1.). Esta resposta nociceptiva é caracterizada por uma resposta rápida nos primeiros 5 minutos após injecção, denominada por fase I, um aumento da resposta entre os 5 e 20 minutos, interfase, e uma fase com frequência constante do número de contrações, durante aproximadamente 40 minutos com uma ligeira diminuição no final, fase II.

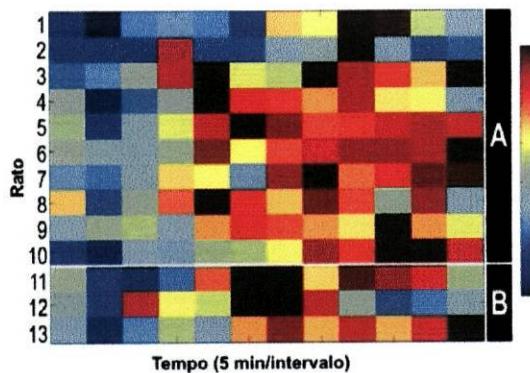


Figura 3.1.1. – Raster com os padrões espaço-temporais das contrações musculares observadas após injecção s. c. de formol na pata do rato (50 µl; região contralateral (A) (n=10) e ipsilateral (B) (n=3) à área de registo). Resultados apresentados em valor médio normalizado por cada intervalo de 5 minutos. Cada linha horizontal representa um animal. O azul escuro representa uma diminuição enquanto que o vermelho escuro representa um aumento do número de contrações da pata injectada.

As contrações musculares apresentam padrões similares para os dois protocolos de injecção aplicados, pata contralateral e ipsilateral à região de registo neuronal. A existência de contrações bilaterais não foi considerada neste estudo.

3.1.2. ACTIVIDADE NEURONAL

No decorrer deste estudo foi analisada a relação entre a dinâmica neuronal populacional associada ao processamento da dor aguda de cariz inflamatório, examinando a estrutura temporal da actividade de disparo dos neurónios e as oscilações de tensão dos potenciais de campo locais (*local field potentials* - LFPs) no eixo tálamo-cortical. A actividade de disparo dos neurónios apresentou um padrão temporal específico durante as contrações musculares induzidas pelo formol enquanto que, os LFPs revelaram uma dinâmica característica em baixas frequências, mais concretamente a nível da banda theta (4-9 Hz), embora não nas altas frequências (Figura 3.1.2.).

Os resultados a seguir apresentados foram obtidos a partir de registos neuronais efectuados em 13 ratos machos adultos da estirpe *Sprague-Dawley* (10 ratos para o protocolo de injecção de formol contralateral e 3 ratos para o protocolo ipsilateral). Foi registado um total de 270 neurónios (20.77 ± 5.29 por rato), durante o período de controlo (prévio à injecção) e de estimulação (após a injecção). No protocolo de injecção contralateral, por cada área de implantação foram registados respectivamente, 98 ± 5.14 neurónios no córtex SI e 114 ± 4.25 no núcleo talâmico VPL. No protocolo ipsilateral, 24 ± 4.58 neurónios em SI e 34 ± 3.51 em VPL.

A injecção de formol induziu uma modulação da taxa de disparo média dos neurónios somato-sensitivos (Figura 3.1.2.). No protocolo contralateral, a taxa de disparo médio aumentou nas duas áreas neuronais registadas. Para o núcleo talâmico VPL aumentou de 3.23 ± 0.35 para 3.63 ± 0.13 Hz ($p < 0.05$), no córtex SI de 4.27 ± 0.22 para

Capítulo III – Resultados

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neurais

4.72 ± 0.11 Hz ($p < 0.05$). No protocolo ipsilateral revelou uma diminuição de 3.17 ± 0.43 para 2.09 ± 0.05 Hz ($p < 0.001$) em VPL, no córtex SI a actividade média manteve-se ao mesmo nível (de 3.01 ± 0.15 para 3.02 ± 0.17 Hz, $p > 0.05$).

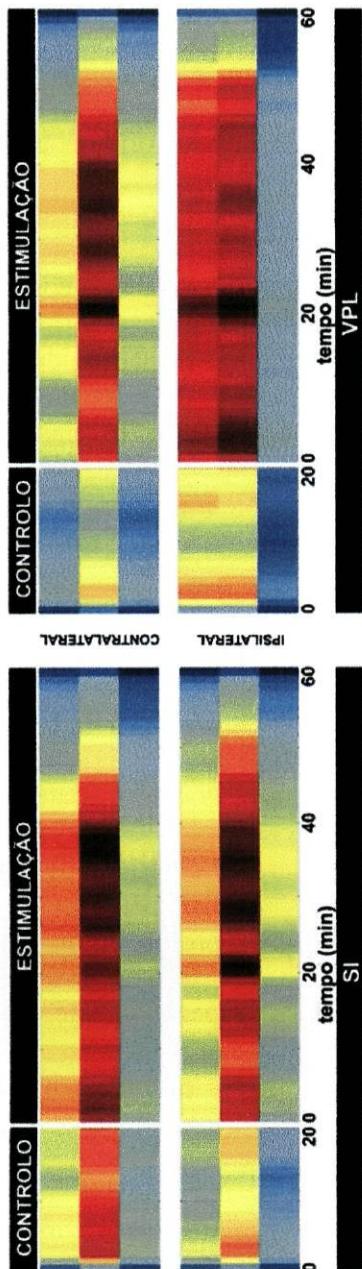


Figura 3.1.2. – Distribuição temporal dos padrões de actividade neuronal para a injeção de formol. Os rasters apresentam a padrões de resposta neuronal durante o período de controlo e estimulação. Padrões de disparo neuronal de 6 animais (3 para o protocolo de injeção contralateral e 3 para o protocolo ipsilateral). Cada linha horizontal representa as alterações da taxa média de disparo normalizada para cada área registada simultaneamente (à esquerda, córtex somato-sensitivo primário (SI); à direita, núcleo talâmico ventro-posterior-lateral (VPL)). O azul escuro representa um aumento enquanto que o vermelho escuro uma diminuição da taxa de disparo. O padrão de código temporal está organizado por região do cérebro. O padrão neuronal de resposta predominante em SI e VPL após a injeção de formol revelou-se excitatório, no entanto, no final da fase II do formol o nível de disparo tende a regressar ao nível associado ao período de controlo.

3.1.3. ACTIVIDADE NEURONAL CORRELACIONADA

A actividade neuronal correlacionada entre pares de neurónios, registados simultaneamente foi analisada para ambos períodos de registo (controlo e estimulação) (Figura 3.1.3.). Após a injecção de formol, o número de neurónios com actividade correlacionada para os dois protocolos de injecção aumentou. O estado de dor aguda modulou o padrão de actividade da maioria dos neurónios que, na fase inicial (período controlo) revelaram um baixo grau de correlação, aumentando após a injecção de formol. A adicionar a esse facto, para ambos os protocolos de injecção, o número de pares de neurónios SI-SI com actividade correlacionada foi superior ao VPL-VPL. Apenas um pequeno número de neurónios evidenciou actividade neuronal correlacionada entre SI e VPL, contudo a injecção de formol traduziu um aumento entre as duas áreas bastante significativo.

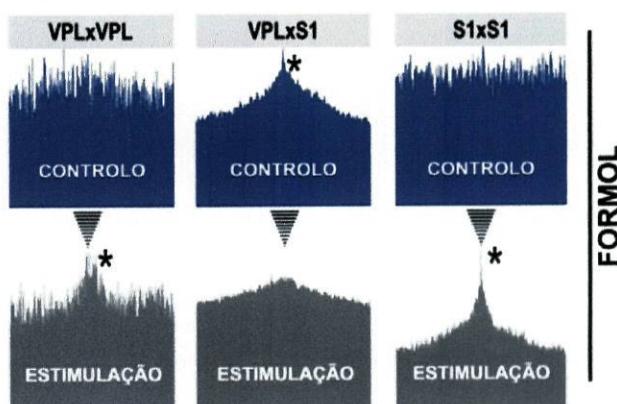


Figura 3.1.3. – Pares de correlogramas cruzados (CCHs) para 6 neurónios contralaterais, registados simultaneamente durante a fase de controlo (não nociceptivo) e de estimulação (nociceptivo). Cada CCHs foi calculado para o período total de registo (antes e depois da injecção de formol). Os pares de neurónios correlacionados encontram-se indicados com asteriscos. A coincidência temporal entre a actividade neuronal de dois neurónios foi calculada utilizando o primeiro neurónio com referência (em fase 0 seg) e a actividade neuronal do segundo neurónio numa janela temporal de ± 2 seg. Os CCHs encontram-se com janelas temporais de bin=5 mseg e “smooth” aplicado por uma função de Gauss (Abeles, 1982).

No protocolo de injecção contralateral, o número de pares de neurónios com actividade neuronal correlacionada aumentou de 10.54 para 18.91% para SI-SI, de 6.97 para 10.83% para VPL-VPL, de 1.35 para 4.49% para SI-VPL. No protocolo ipsilateral, a percentagem de neurónios com actividade correlacionada também aumentou em todas as áreas registadas. A percentagem de pares correlacionados variou de 7.62 para 10.47% em SI-SI, de 4.25 para 8.51% em VPL-VPL e de 0.36% para 3.32% SI-VPL.

3.1.4. PADRÕES DE CODIFICAÇÃO NEURONAL

Para analisar padrões específicos de codificação neuronal foram utilizados histogramas do tipo peri-evento/raster (PSTHs). Os PSTHs permitem estudar e classificar os padrões de disparo dos neurónios ou LFPs em função de um ou mais eventos de interesse. Neste modelo de dor o interesse foi endereçado para a análise das contrações musculares espontâneas da pata injectada. Este comportamento, como já foi referido, funciona como um indicador da evolução do processo nociceptivo inflamatório para este modelo de dor, estando associado a picos de dor, daí o interesse na análise da assinatura neuronal associada ao mesmo.

Através dos PSTHs foram observados três tipos de padrões de disparo nas duas áreas registadas durante a ocorrência das contrações musculares. Estes padrões foram utilizados para classificar as células em três categorias, como excitatórias, inibitórias ou sem alterações do padrão de disparo. As respostas encontradas foram predominantemente de carácter excitatório, no entanto ocasionalmente foram também encontradas respostas inibitórias, tal como ilustra a Figura 3.1.4.

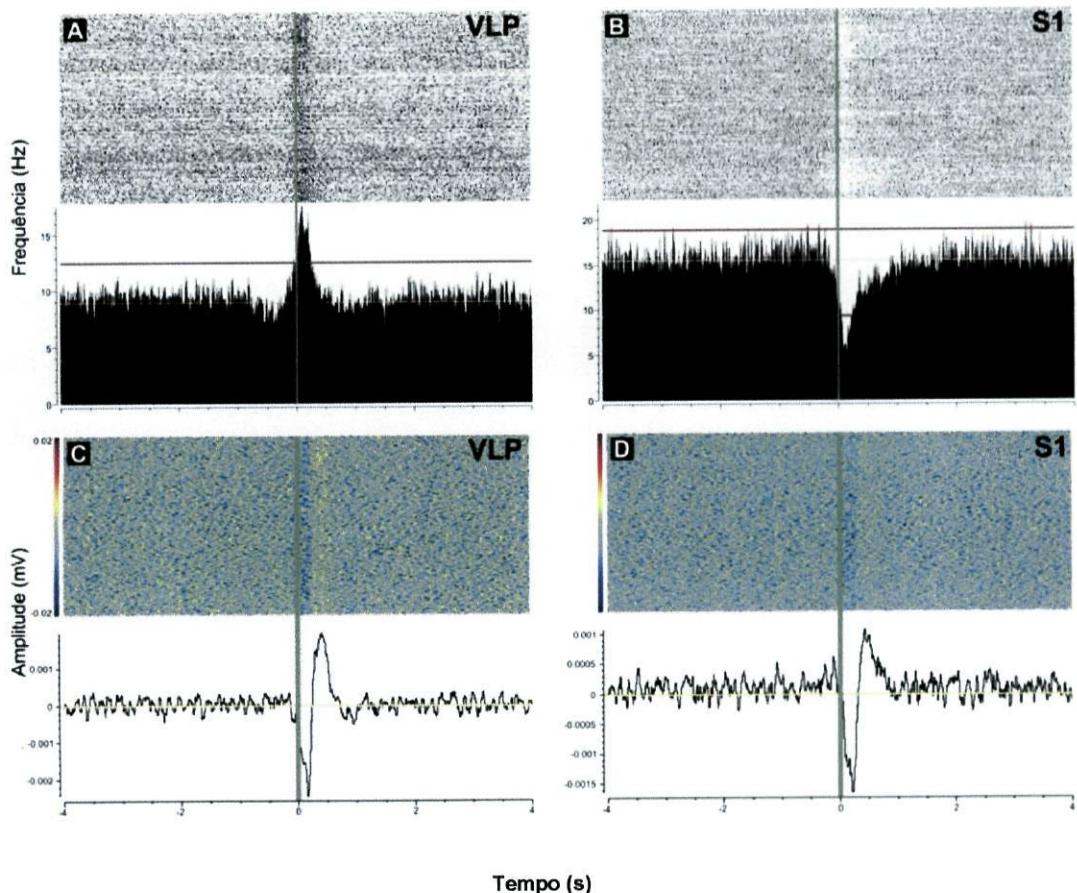


Figura 3.1.4. – Histogramas de peri-evento/raster ilustrando os comportamentos padrão de actividade neuronal associada às contrações musculares da pata injectada com formol. Neurónio do núcleo talâmico VPL com comportamento excitatório (**A**), neurónio do córtex SI com comportamento inibitório (**B**), ambos registados simultaneamente no mesmo animal durante uma hora após injeção de formol. Potenciais de campo locais (LFPs) registados em paralelo utilizando os eléctrodos de registo de actividade de disparo neuronal (LFPs registados no núcleo talâmico VPL (**C**) e córtex SI (**D**)), com uma frequência de amostragem de 500 Hz apresentando um sincronismo com os eventos de contração muscular da pata injectada. A actividade de disparo neuronal e LFPs apresentada no intervalo 4 segundos pré e pós contração muscular - tempo zero (linha verde). A média de taxa de disparo apresentada pela linha a amarelo, com limites mínimo e máximo de confiança de 95% (linhas a vermelho).

No córtex SI e núcleo talâmico VPL, para o protocolo de injeção contralateral a resposta mais comum foi excitatória todavia, alguns neurônios apresentaram também respostas inibitórias. Para a aplicação contralateral, no córtex SI, dos 98 neurônios registrados, 46 apresentaram respostas excitatórias em relação às contrações musculares selecionadas, 26 respostas inibitórias e os restantes 26 neurônios não alteraram o seu

padrão de disparo. A nível do núcleo talâmico VPL, 47/114 células evidenciaram comportamento excitatório e 9/114 inibitório. A maioria das células (58/114) não alterou o seu padrão de resposta.

Para o protocolo ipsilateral, a maioria dos neurónios não alterou o seu padrão de disparo em relação à contração muscular (14/24 neurónios em SI e 24/34 em VPL). Com comportamento excitatório foram registados 6/24 neurónios em SI e 7/34 em VPL. Os restantes neurónios revelaram respostas inibitórias, com 4/24 e 3/34 respectivamente, em SI e VPL.

3.1.5. CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS DOS POTENCIAIS DE CAMPO LOCAIS (LFPs)

Os registos de LFPs evidenciaram a presença de uma banda de frequência característica no intervalo *theta* (4-9 Hz), organizada de forma dinâmica sugerindo que as contrações musculares da pata injecta poderão estar associadas a alterações na actividade neuronal nesta banda e por conseguinte associadas ao processamento de informação nociceptiva durante picos de dor.

Os histogramas de densidade espectral de potência (PSDs) revelaram que a potência do sinal adquirido nesta banda, a partir da área do núcleo VPL é superior ao sinal registado em SI (Figura 3.1.5.1.). Por outro lado, não foram observadas diferenças entre os protocolos contralateral e ipsilateral.

Os spectrogramas dos LFPs durante o período de estimulação revelaram uma potência superior na banda *theta*, quando comparados com o período de controlo. Todavia, o facto de no período de controlo (pré injecção de formol) também poderem ser encontrados aumentos na potência do sinal na referida banda poderá estar associado a comportamentos do animal, nomeadamente durante a fase exploratória da câmara de

registro. Os spectrogramas evidenciaram ainda a existência de uma coerência temporal na banda *theta*, entre o córtex e tálamo, após a injecção de formol (fase nociceptiva). Todavia, este padrão espectral durante o período de controlo não apresentou sincronismo temporal em picos, entre as duas áreas de registo.

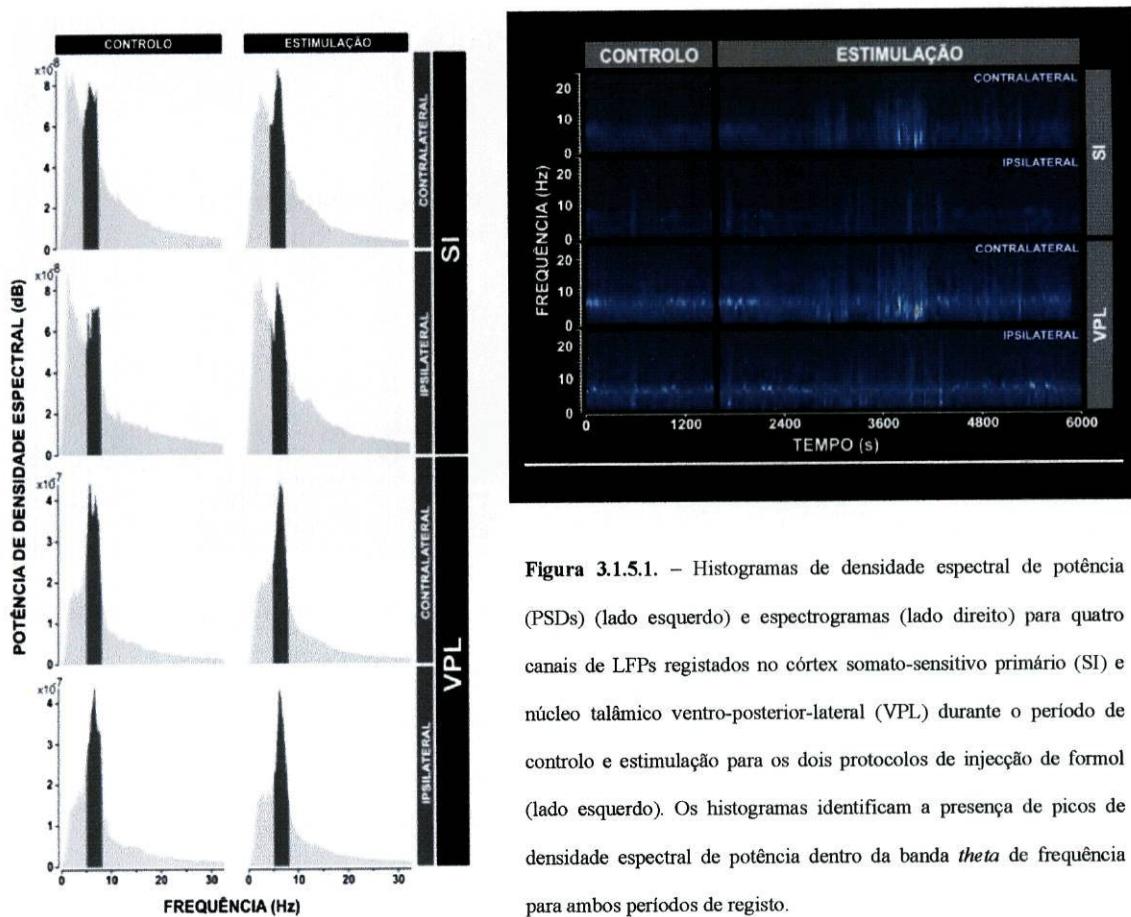


Figura 3.1.5.1. – Histogramas de densidade espectral de potência (PSDs) (lado esquerdo) e spectrogramas (lado direito) para quatro canais de LFPs registados no córtex somato-sensitivo primário (SI) e núcleo tálâmico ventro-posterior-lateral (VPL) durante o período de controlo e estimulação para os dois protocolos de injecção de formol (lado esquerdo). Os histogramas identificam a presença de picos de densidade espectral de potência dentro da banda *theta* de frequência para ambos períodos de registo.

O algoritmo de procura implementado para a normalização do sinal de LFPs a partir dos PSDs e procura de picos de densidade espectral de potência na banda *theta*, possibilitou a detecção precisa do tempo de ocorrência desses eventos (função `FindContra.m`, Anexo A.2.). Durante o desenho deste algoritmo foram atribuídas diversas denominações aos eventos seleccionados. Assim, a todos os picos de aumento da potência do sinal na banda em causa foi atribuída a denominação de “*eventos falsos – positivos*”

Capítulo III – Resultados

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

(FPE). O número de eventos encontrados para ambos períodos de registo estão summarizados no “raster” da Figura 3.1.5.2.

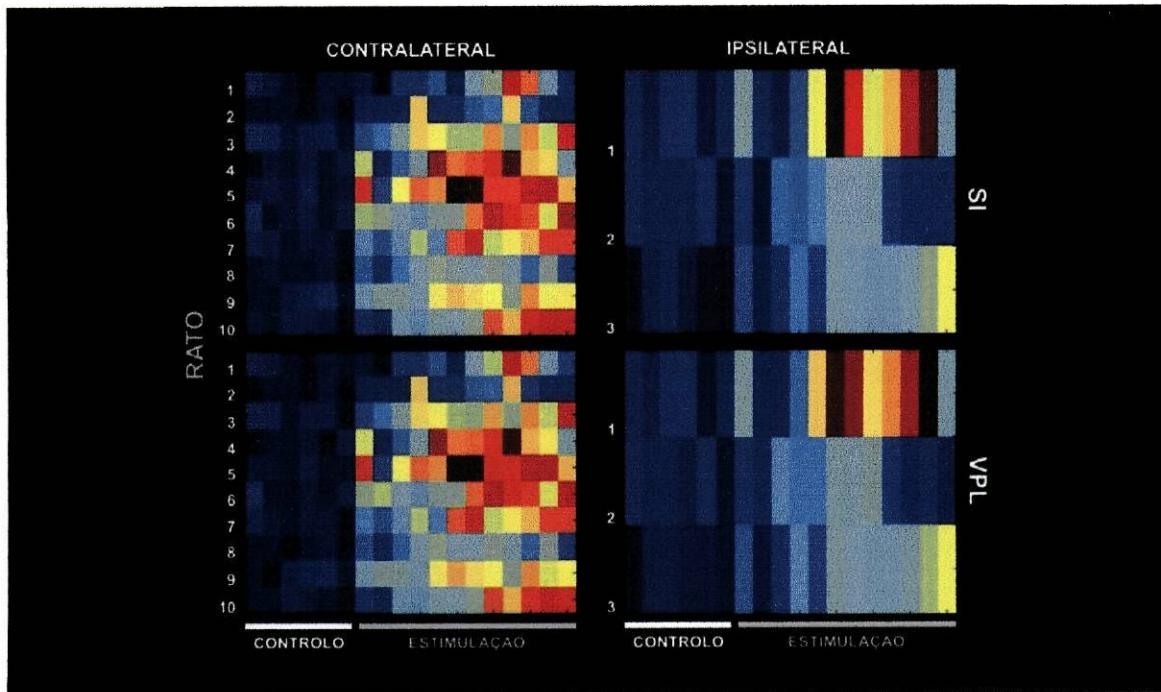


Figura 3.1.5.2. - Evolução temporal do número de aumentos da densidade espectral de potência (eventos-falsos positivos, FPE) no sinal registado durante a fase de controlo (pré injecção de formol) e estimulação (pós injecção de formol). Os dados são apresentados em valor médio por cada intervalo de 5 minutos. Cada linha horizontal representa as alterações no número de eventos normalizados na banda *theta* para cada rato. As cores mais próximas do azul representam uma diminuição enquanto que as mais próximas do vermelho representam um aumento.

Em ambos protocolos experimentais para o sinal registado em SI e VPL parece existir o mesmo padrão. Todavia, durante o período pré injecção de formol os picos encontrados, em número inferior, apresentam um padrão diferente. Esta variação poderá estar associada a comportamentos exploratórios do rato que, de animal para animal apresentam padrões aleatórios de ocorrência temporal.

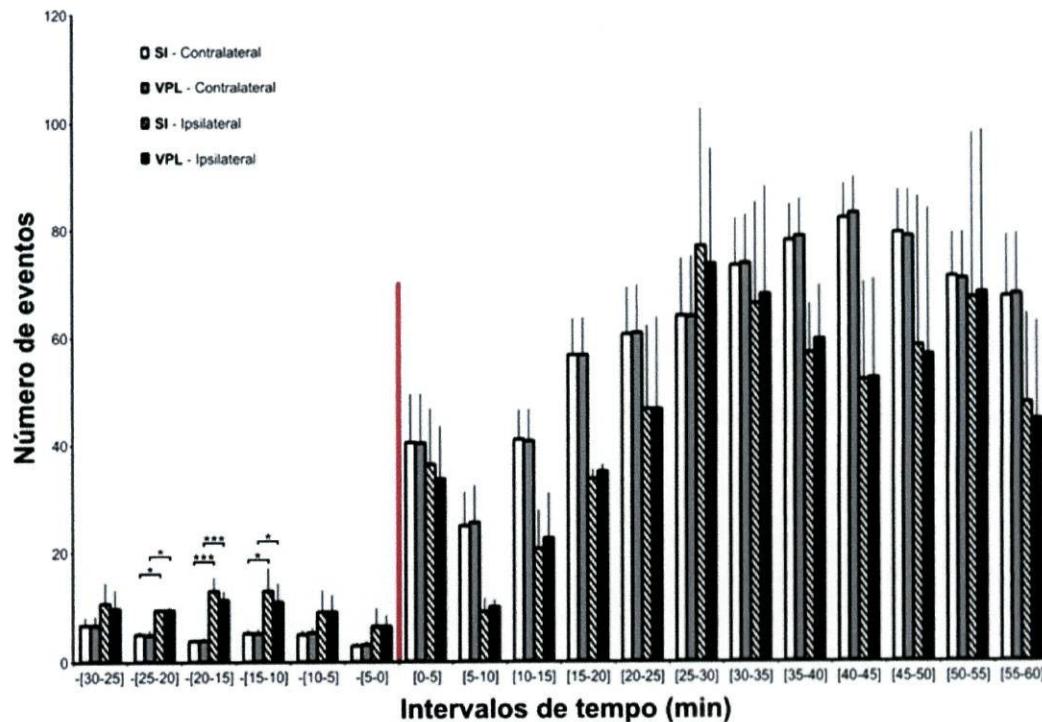


Figura 3.1.5.3. - Evolução temporal do número de eventos absolutos encontrados para aumentos de picos de densidade espectral de potência, durante a fase controlo e estimulação por formol (Eventos falsos – positivos, FPE). Dados apresentados em média por cada intervalo de 5 minutos. Linha vertical a vermelho separa o período controlo e estimulação indicando o tempo de injeção. Comparação entre o número de FPE entre os dois protocolos de injeção de formol realizada para cada região de registo utilizando o teste *t*-Student, sendo que para valores de probabilidade inferiores a 0.05 foi considerada a existência de diferenças significativas no número de FPE. Apenas foram encontradas diferenças entre os dois protocolos de injeção para o período pré formol.

O número de FPE processados pelo algoritmo primeiro, quando analisados os dois períodos de registo, estes estão presentes em ambos. Segundo, após a injeção de formol, o número de FPE aumenta quando comparado com o controlo. Esta oscilação está correlacionada com a evolução do processo doloroso induzido pela aplicação periférica de formol. Por último, apenas foram encontradas diferenças entre os dois protocolos de injeção (contralateral e ipsilateral) durante o período de controlo. Nos quais o número de FPE para o protocolo contralateral revelou ser inferior ao ipsilateral para SI e VPL (Figura 3.1.5.3.).

Durante a fase I (0-5 minutos, após formol), o número de FPE aumenta significativamente, mantendo-se posteriormente constante durante a fase II (~40 minutos), sofrendo uma diminuição seguida por um aumento durante a interfase do formol (5-20 minutos, após formol) até ao início da fase II.

Os dados estatísticos revelaram não existir diferenças entre os protocolos contralateral e ipsilateral após a injecção de formol quanto ao número de FPE. Estes dados indicam que não existe dominância de um hemisfério de registo em detrimento do outro.

3.1.6. ALGORITMO DE PROCURA

O algoritmo de procura foi desenhado com três propósitos. Primeiro, encontrar o tempo de ocorrência de picos na banda de frequência *theta*. Segundo, promover a comparação com os dados comportamentais observados nos registos de vídeo, testando a existência ou não de sincronismo entre as oscilações do sinal e as contrações musculares na pata injectada. Por último, promover a identificação semi-automática dos tempos de ocorrência de contrações musculares através da análise do sinal dos LFPs.

O grau de eficiência do algoritmo implementado na procura dos tempos associados a cada contração muscular da pata foi aferido mediante comparação com as observações em vídeo. Na Figura 3.1.6., são apresentados os resultados obtidos pela procura do algoritmo implementado, no que diz respeito aos eventos FPE e TPE no sinal dos LFPs para o córtex SI e núcleo talâmico VPL e protocolos de injecção.

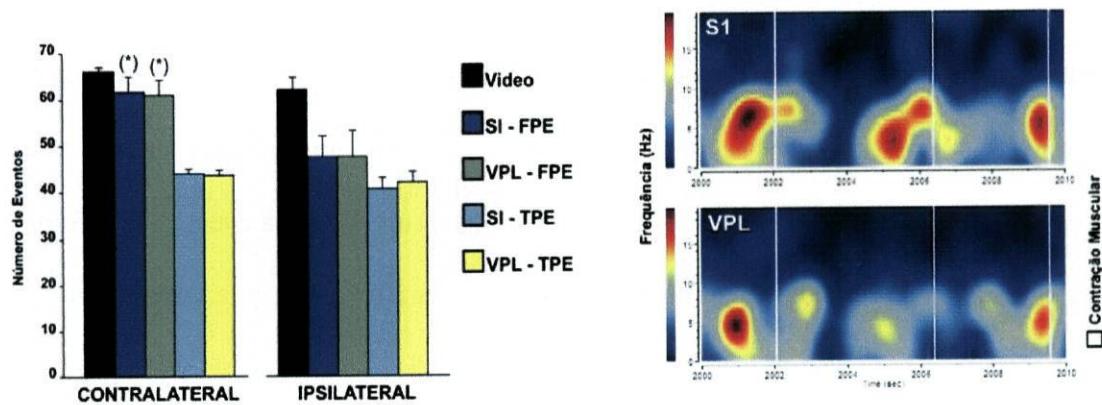


Figura 3.1.6. – Comparação do número de contrações musculares da pata injectada do rato, observadas em vídeo (OE) e o número de eventos do tipo FPE e TPE, encontrados e seleccionados pelo algoritmo de procura na banda 4-9 Hz para os dois protocolos de injecção de formol (lado esquerdo). Dados apresentados como valor médio por intervalo de 5 minutos \pm erro padrão da média por rato. Na comparação entre o número de eventos de cada classe para os dois protocolos de injecção de formol foi considerada a existência de diferenças significativas para valores de probabilidade inferiores a 0.05 (*). Sinal naïve de potenciais de campo locais (LFPs) registados no córtex SI e núcleo talâmico VPL de um rato, ilustrando um aumento da potência do sinal em ambas as regiões registadas durante o período que precede a contração muscular da pata injectada. As linhas verticais brancas representam o tempo em vídeo das contrações musculares observadas (OE). Espectrografia de LFPs construído com uma FFT de comprimento 512 pontos, com salto de 2 mseg. Aumento da densidade espectral de potência do sinal dos LFPs representado a vermelho e a diminuição a azul.

Os protocolos de injecção de formol, contralateral e ipsilateral, revelaram um número similar de contrações observadas (OE), durante o período de 1 hora após formol, com respectivamente 65.83 ± 1.13 e 62.03 ± 2.83 (dados apresentados em média por intervalo de 5 minutos \pm erro padrão da média por rato). Por outro lado, o algoritmo de procura implementado seleccionou 61.63 ± 8.33 eventos do tipo FPE em SI e 61.03 ± 3.38 em VPL para o protocolo contralateral. Para o protocolo ipsilateral, 47.67 ± 8.42 eventos FPE em SI e 47.61 ± 5.57 em VPL. Os resultados da procura revelaram ser similares para as duas regiões neuroniais. Todavia, foram observadas diferenças quando comparados os dois protocolos de injecção (ver Figura 3.1.6.).

O número de eventos do tipo TPE para ambos protocolos revelaram um padrão similar para SI e VPL. Para SI, 44.09 ± 1.00 eventos (contralateral) e VPL 43.83 ± 1.01

(contralateral), e SI 40.69 ± 2.39 (ipsilateral) e VPL 42.03 ± 2.32 (ipsilateral). Através dos resultados obtidos foi possível concluir que o algoritmo implementado foi mais preciso na detecção dos tempos das contrações no protocolo ipsilateral, no qual a diferença entre eventos do tipo FPE e TPE é inferior. Por outro lado, os resultados para eventos TPE foram idênticos em ambos protocolos tendo o algoritmo de procura revelado uma taxa de eficácia de 2 em cada 3 eventos do tipo FPE encontrados.

3.1.7. HISTOLOGIA

Para a localização dos microeléctrodos de registo foi promovida a injeção de micro-corrente através dos mesmos, com o objectivo de revelar o local de registo (identificado pelo pontos a preto) nas fatias histológicas. As localizações dos locais de registo deste estudo são apresentadas na Figura 3.1.7.

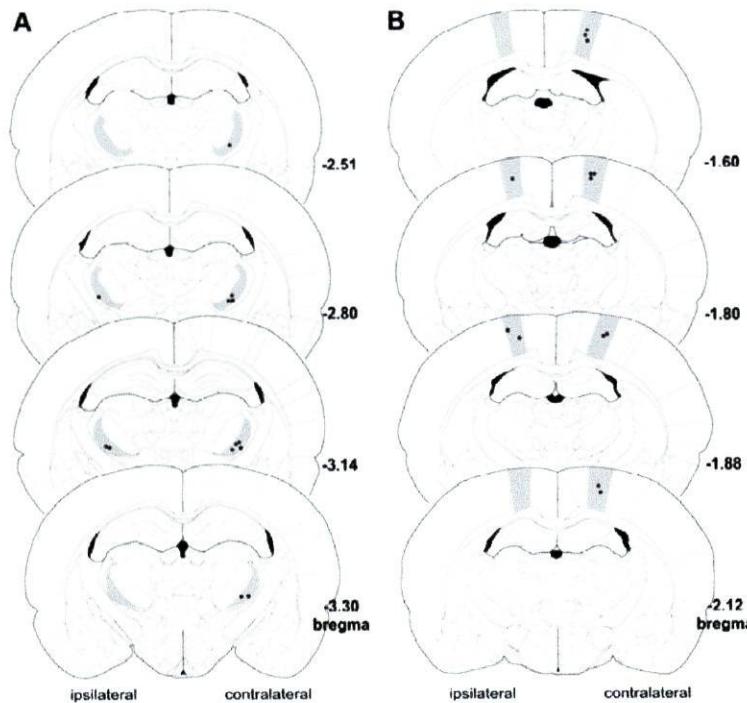


Figura 3.1.7. – Esquema indicando a localização dos locais de registo no núcleo talâmico ventro-posterior-lateral (A) e córtex somato-sensitivo primário (B). Os pontos a preto identificam os locais marcados pela injeção de corrente através dos microeléctrodos.

3.2. MODELO II – DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA

Nesta parte do presente estudo o interesse foi direcionado para a análise das alterações no ciclo circadiano do rato induzidas pela instalação de uma condição de dor neuropática periférica. Os resultados a seguir apresentados foram obtidos a partir de registos neuronais efectuados em três ratos machos adultos da estirpe *Sprague-Dawley*. Em cada área neuronal (córtex SI e núcleo talâmico VPL) foram registados simultaneamente dois canais de LFPs. Os registos abrangeram o período de controlo e de dor (após cirurgia SNI). Em cada período foram realizadas duas sessões de registo contínuo, cada uma com uma duração total de 24 horas repartidas em 12 horas de fase diurna e 12 horas de fase nocturna. As sessões de registo foram realizadas nos dias -10 e -2 (período de controlo), +2 e +10 (período de dor) relativamente à cirurgia SNI.

3.2.1. O MODELO ANIMAL DE DOR

O nível de sensibilidade à estimulação mecânica no período de controlo e de dor (após cirurgia SNI) foi avaliado com filamentos do tipo *von Frey*. Este teste permitiu avaliar e comparar o nível de dor e a sua estabilidade entre os dois períodos de registo. As respostas à estimulação da pata não revelaram diferenças significativas entre as duas sessões de registo realizadas no mesmo período. Todavia, após a implementação do modelo de dor o limiar de força nominal necessária para induzir uma resposta da pata do rato, diminuiu de 17.6 ± 1.1 g (período de controlo) para 2.8 ± 0.3 g (período de dor) (média±E.P., $p < 0.05$) (Figura 3.2.1.).

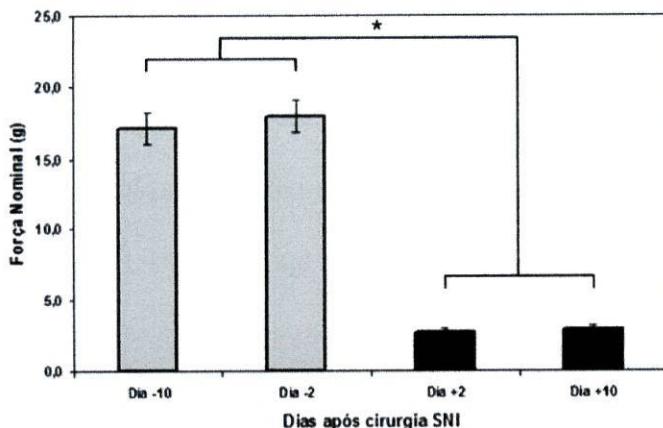


Figura 3.2.1. - Alterações na sensibilidade da pata do rato. Limites dos reflexos mecânicos de flexão médios (em grama) após estimulação da superfície plantar com uma série de filamentos de *von Frey* (duas leituras por sessão de registo neuronal). Os animais após a implementação do modelo de dor SNI (dias +2 e +10) apresentaram uma redução significativa da força nominal necessária para indução da uma resposta da pata estimulada.

Durante o período de dor após lesão do nervo os animais revelaram vários comportamentos. Os mais comuns foram o recolher da pata da intervenção cirúrgica e a exibição esporádica de contrações musculares da mesma. Por outro lado, durante o período de sono optaram por uma postura de protecção da mesma.

3.2.2. DEFINIÇÃO DE ESTADOS E CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS

Através da metodologia proposta por Gervasoni et al. (2004) e Lin et al. (2006) foram considerados seis estados identificados por diferentes propriedades espectrais. Dentro deste leque de comportamentos os três estados com maior frequência nos registos neurais foram: o estado WK caracterizado por uma baixa amplitude do sinal dos LFPs e por uma alta potência na banda *theta* (4-9 Hz); o estado SWS caracterizado por uma amplitude de oscilação do sinal elevada e baixa frequência; e o estado REM caracterizado por uma baixa amplitude do sinal dos LFPs e por uma frequência elevada similar à

observada no estado WK (Figura 3.2.2.1.). Para além dos estados anteriores foram classificados mais dois estados menos frequentes nos registos neuronais: o estado WT caracterizado por uma oscilação rítmica das vibrissas do rato (7-12 Hz) e o estado M no qual foram incluídos todos os comportamentos do rato que não possuem características espectrais padrão. Por último, o estado U classificado como um estado de transição entre estados neuronais.

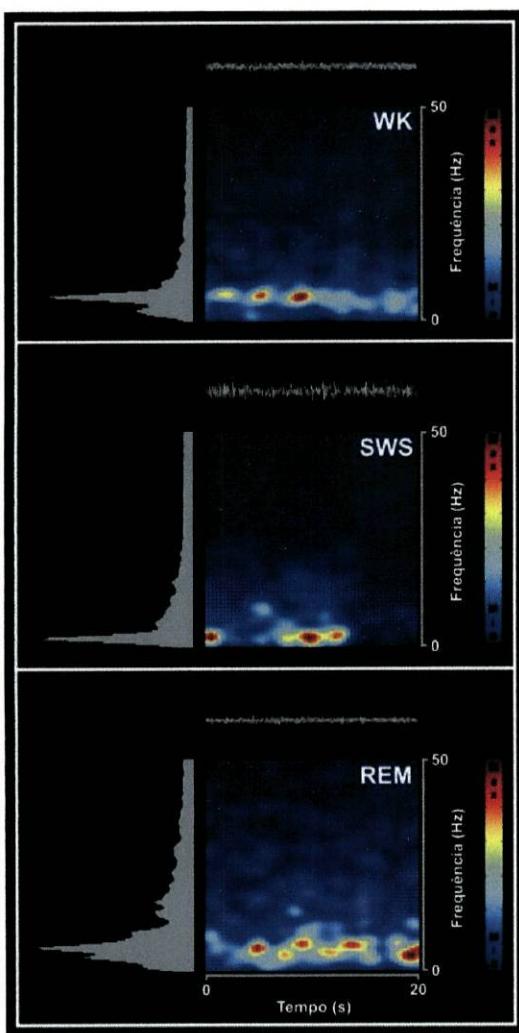


Figura 3.2.2.1. – Características e propriedades espectrais dos três estados neuronais de maior frequência. Estado de vigília (WK), caracterizado por uma baixa amplitude do sinal dos LFPs e uma alta amplitude na banda *theta* (4-9 Hz); estado de *slow-wave-sleep* (SWS), caracterizado por flutuações com uma frequência na banda 10-14 Hz sobreposta com ondas do tipo *delta* (1-4 Hz) e o estado de *rapid-eye-movement* (REM), caracterizado por baixas amplitudes globais do sinal e altas amplitudes na banda *theta* e *gamma* (30-35 Hz).

A inspecção extensiva do sinal dos LFPs (Figura 3.2.2.2.) confirmou a presença de oscilações em amplitude e frequência para todos os estados comportamentais sendo particularmente perceptíveis durante as suas transições (Figura 3.2.2.3.B-C). Por outro lado

e devido ao facto de alguns estados comportamentais partilharem características espectrais semelhantes cria uma certa ambiguidade a nível dos espectrogramas na sua separação e identificação. Exemplo disso são as oscilações na banda *theta* (4-9 Hz) presentes no estado WK e REM (Figura 3.2.2.1.). Este problema não se coloca quando é aplicada a metodologia proposta por Gervasoni et al. (2004) que permite a sua identificação inequívoca (Figura 3.2.2.3.A.).

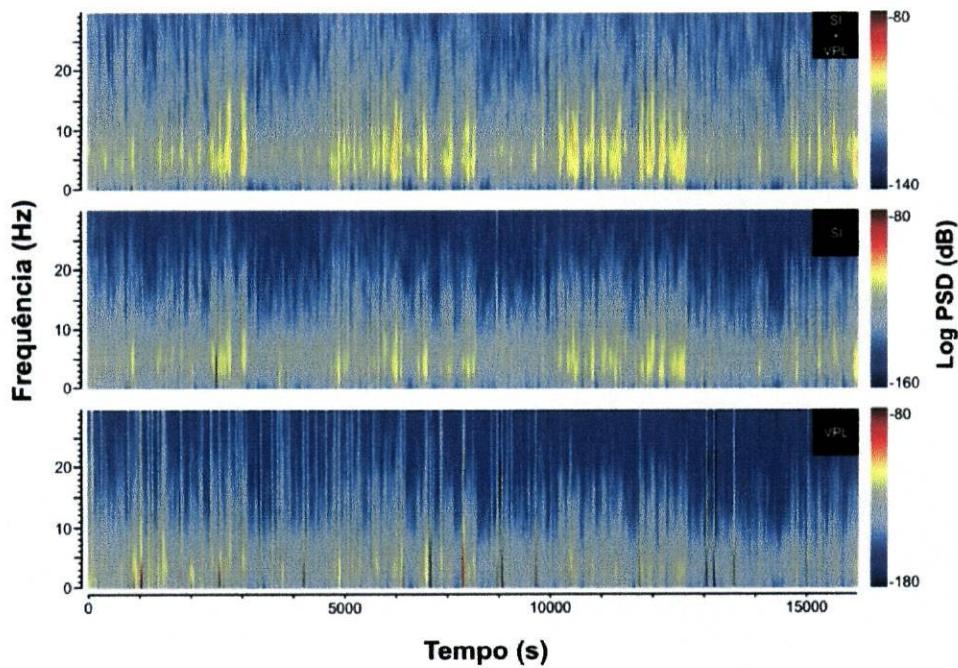


Figura 3.2.2.2. – Espectrogramas do registo neuronal de dois canais de LFPs referentes a uma janela de registo contínuo com duração aproximada de 5 horas, realizado durante a fase diurna do ciclo circadiano do rato. Espectrograma superior referente ao sinal médio dos dois canais de LFPs (SI+VPL). Espectrograma central referente ao sinal registado no córtex SI e inferior referente ao sinal do núcleo talâmico VPL. Os espectros das duas áreas neuronais, em conjunto e separado revelaram padrões de oscilação semelhantes.

A observação do sinal de LFPs registado nas regiões cortical e talâmica revelou a presença de padrões específicos de oscilação associados a cada estado comportamental. Estas oscilações ocorrem simultaneamente nas duas regiões neuronais (Figura 3.2.2.2.).

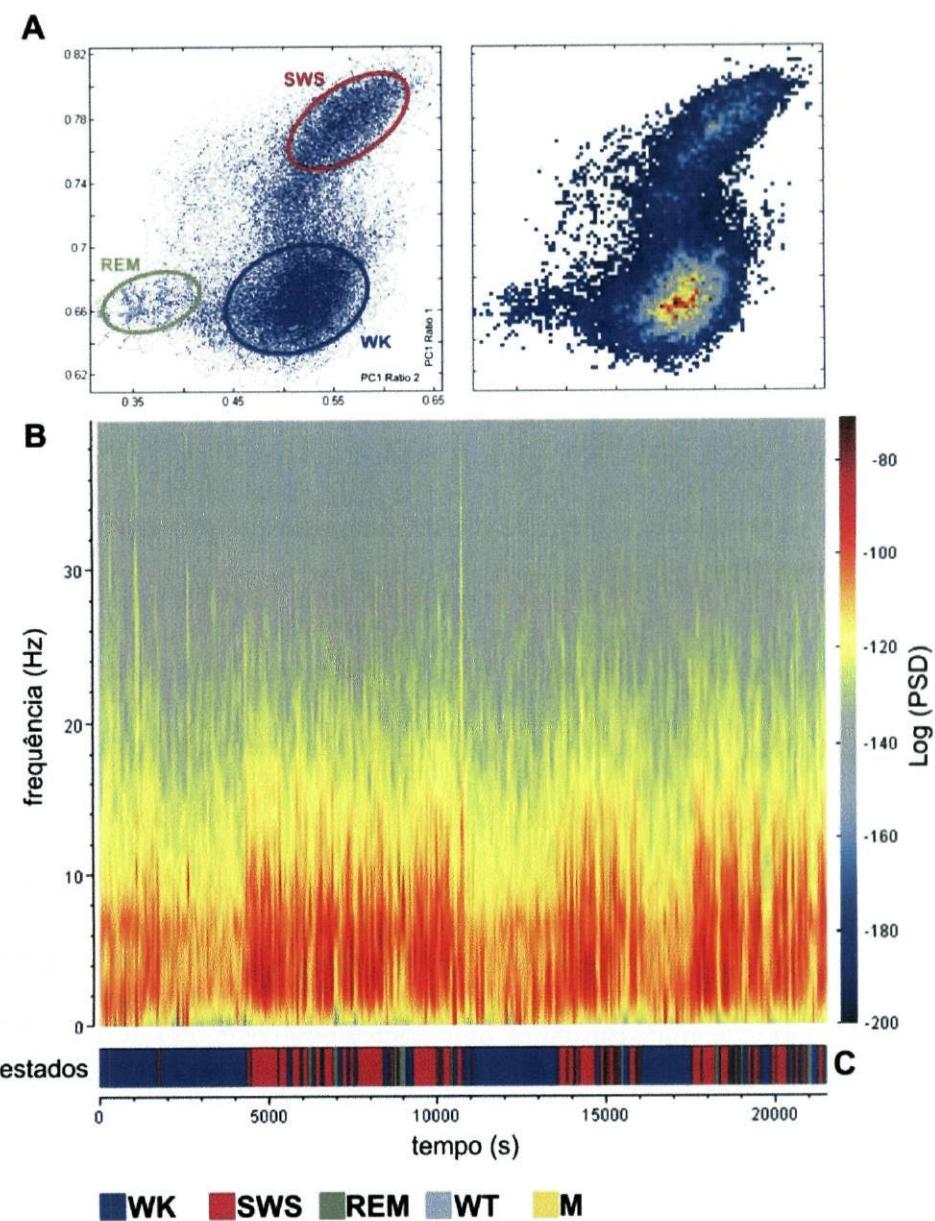


Figura 3.2.2.3. – **A.** Mapa de estados após eliminação dos segmentos com amplitude de saturação (representando 0.77-1.13% do total da duração do registo). No mapa são visíveis três aglomerados de pontos diferentes, a azul os episódios do estado de vigília (WK), a vermelho do estado *slow-wave-sleep* (SWS) e a verde do estado *rapid-eye-movement* (REM).

B. Espectrograma de um canal LFP registado no córtex somato-sensitivo SI durante 6 horas na fase diurna do ciclo circadiano do rato. **C.** Hipnograma com a sequência temporal dos episódios comportamentais referentes ao sinal apresentado em (B). Através da análise do alinhamento temporal entre o espectrograma e o hipnograma é possível observar as oscilações espectrais associadas aos diferentes estados comportamentais considerados.

Os mapas de estados foram construídos com um número finito de pontos associados a cada estado comportamental exibido (Figura 3.2.2.3.A.). Estes mapas foram aplicados na identificação dos episódios de cada estado e na análise das transições entre episódios (Figura 3.2.2.3.C.). As trajectórias espectrais que ligam as transições de um estado para outro são caracterizadas por padrões espaciais de duração específica. As mais frequentes no ciclo circadiano do rato são as que ocorrem entre os estados WK→SWS→WK, WK→SWS→REM→WK e WK→WT→WK (Gervasoni et al., 2004).

Quando é representada a velocidade das trajectórias espectrais espontâneas sobre o mapa de estados (valor obtido dividindo a distância entre dois pontos consecutivos do mapa de estados pelo tempo que os separa, p. e. 1 seg.), as regiões nas quais existe pouca variação espectral (área a azul escuro, Figura 3.2.2.4) coincidem com os aglomerados de pontos referentes aos estados identificados pelo algoritmo (delimitação a azul [estado WK], a vermelho [estado SWS] e a verde [estado REM]) (Figura 3.2.2.3.A.). Por outro lado, as regiões com oscilações espectrais rápidas (área a azul claro, Figura 3.2.2.4) correspondem a zonas de transição entre os aglomerados de pontos dos episódios dos estados comportamentais (ver p. e., região de transição entre WK e SWS assinalada com uma seta a branco na Figura 3.2.2.4). A observação dos resultados obtidos sugere que os mecanismos anatómicos e fisiológicos que governam as trajectórias espectrais entre os diferentes estados de comportamento são conservados entre os diferentes ratos. A excepção é o estado WT que para os diferentes ratos ocupa uma posição variável no mapa de estados. No entanto, o histograma de densidade espectral de potência (PSD) do estado WT é bastante similar entre os diferentes animais, com picos dominantes na banda de frequência 7-12 Hz.

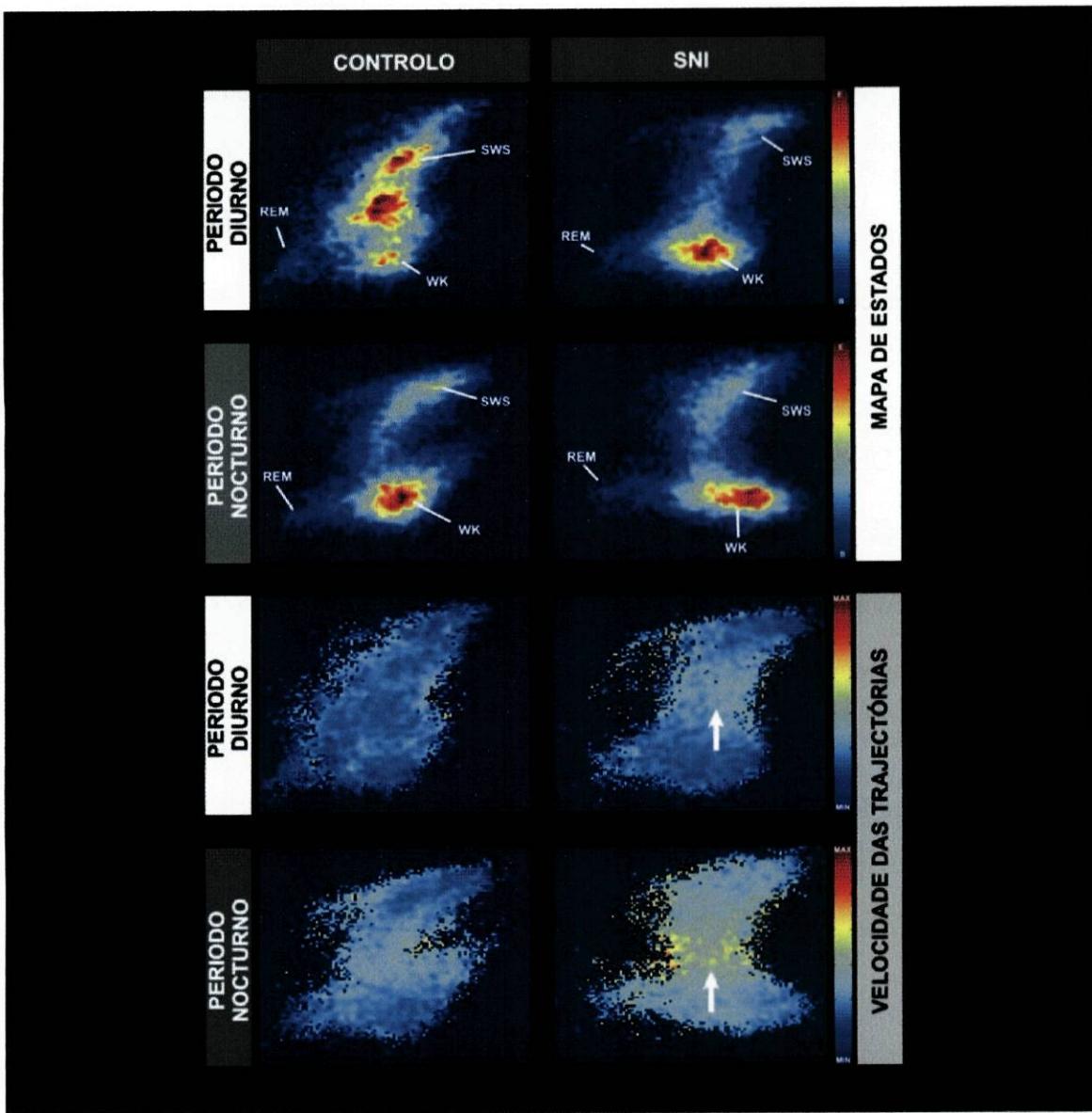


Figura 3.2.2.4. – Mapas de estados e velocidade espontânea das trajectórias espectrais para o rato #2. Análise em conjunto dos sinais de LFPs da região SI e VPL registados durante o período de controlo e de dor (24 horas por sessão de registo). Através da observação dos mapas de estados é possível visualizar alterações no número de episódios dos estados comportamentais WK e SWS durante o período de dor. A velocidade das trajectórias espontâneas para as transições entre os estados WK e SWS apresentou ainda um aumento durante o período de dor na fase diurna e nocturna de registo (regiões assinaladas com as setas).

Durante o período de dor a velocidade das trajectórias espontâneas do tipo WK→SWS→WK sofreram um acréscimo significativo em ambas as fases de registo (Figura 3.2.2.4, região assinalada com setas). Este acréscimo surge acoplado a um aumento do número de transições entre os estados comportamentais WK e SWS.

3.2.3. ESTADOS DE COMPORTAMENTO NEURONAL E A CONDIÇÃO DE DOR

A instalação da condição de dor alterou o tempo total dispensado pelos animais em alguns estados comportamentais (Figura 3.2.3.1.A.). Estas alterações estão presentes durante a fase diurna e nocturna do registo neuronal. A título de exemplo foi observada uma diminuição significativa do tempo que os ratos passam no estado SWS durante a fase diurna do período de dor (246.76 ± 34.01 para 147.17 ± 20.44 minutos [fase diurna, análise de SI+VPL]; 216.56 ± 14.80 para 146.16 ± 30.08 minutos [fase diurna, análise de VPL], $p < 0.05$).

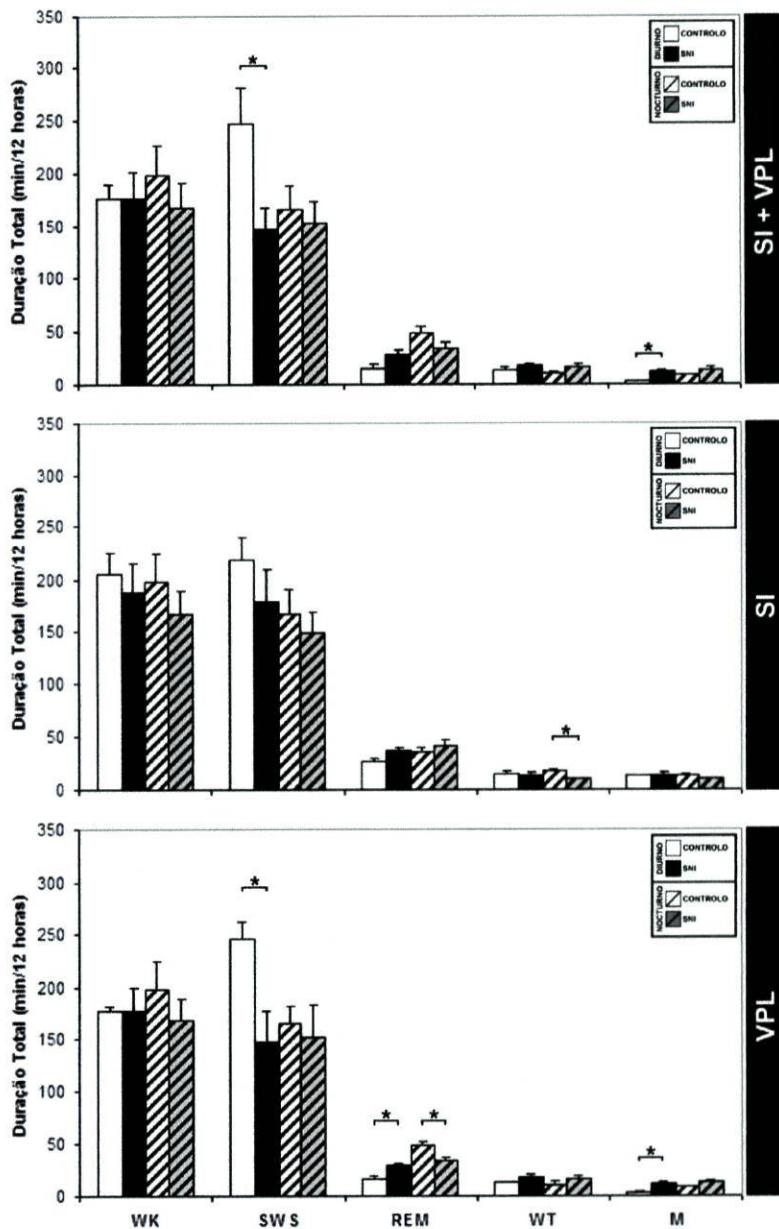


Figura 3.2.3.1.A. – Tempo total dispensado em media por rato em cada estado durante as fases diurna e nocturna do período de controlo e de dor (após cirurgia SNI). WK, estado de vigília; SWS, estado de slow-wave-sleep; REM, estado de *rapid-eye-movement*; WT, oscilação das vibrissas (*whisker-twitching*); M, movimento indefinido; e U, estado de transição. Os resultados para o processamento em conjunto dos canais de LFPs de SI+VPL e isolado dos canais SI e VPL. O tempo total dispensado no estado SWS apresentou uma redução durante a fase diurna de registo e na fase nocturna não apresentou alterações. Os restantes estados não apresentaram alterações significativas, as excepções foram o estado M durante a fase diurna para a análise dos canais de SI+VPL e VPL com aumento, o estado WT durante a fase nocturna para a análise de SI com uma diminuição e o estado REM durante as fases diurna e nocturna para a análise de VPL, respectivamente com um aumento e com uma diminuição. A existência de diferenças significativas foi tida em conta para valores de probabilidade inferiores a 0.05.

Capítulo III – Resultados

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neurais

No que diz respeito ao estado de transição U foi observado um aumento do tempo total dispensado neste estado durante o período de dor (Figura 3.2.3.1.B). Na análise em conjunto dos canais de LFPs de SI e VPL, este aumento foi observado nas fases diurna e nocturna de registo (266.38 ± 20.55 para 336.84 ± 7.10 min [fase diurna]; 289.67 ± 21.01 para 336.71 ± 6.30 min [fase nocturna], $p < 0.05$). Na análise isolada dos sinais de SI não foram observadas diferenças. Para os sinais registados no núcleo talâmico VPL apenas foram observadas diferenças durante a fase diurna (243.04 ± 13.44 para 291.51 ± 10.70 min [fase diurna], $p < 0.05$).

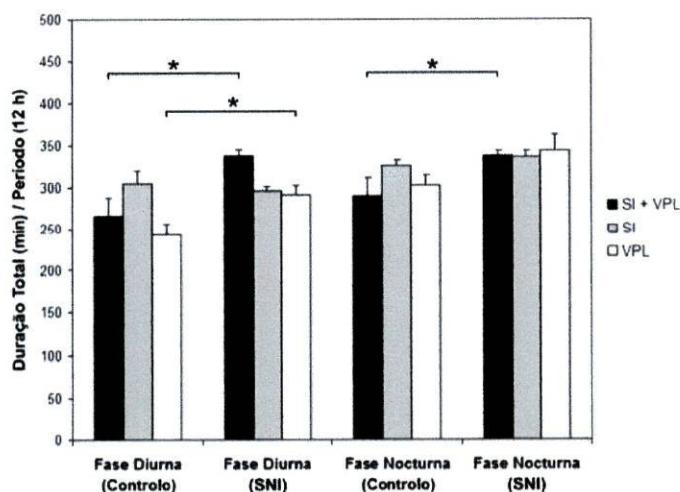


Figura 3.2.3.1.B. – Tempo total dispensado em média por rato no estado U durante as fases diurna e nocturna do período de controlo e de dor (após cirurgia SNI). Na análise em conjunto dos sinais de LFPs de SI e VPL, em ambas as fases de luz durante o período de dor foi observado um aumento do tempo total dispensado no estudo U. A análise isolada dos sinais registados em VPL revelou igualmente um aumento do tempo total no estado U, embora apenas durante a fase diurna. Para a análise isolada dos sinais de SI não foram observadas alterações. A existência de diferenças significativas foi tida em conta para valores de probabilidade inferiores a 0.05.

Na análise do número de episódios de cada estado neuronal comportamental foram encontradas diferenças entre o período de controlo e de dor (Figura 3.2.3.2.). Todavia,

estas diferenças não reflectiram oscilações significativas na duração média de cada episódio entre os dois períodos de registo neuronal.

Na análise em conjunto do sinal dos LFPs de SI e VPL (Figura 3.2.3.2., histogramas da linha superior) o número de episódios do tipo WK diminuiu durante o período de dor (398.20 ± 73.20 para 259.60 ± 18.31 [fase diurna]; 432.21 ± 80.31 para 312.00 ± 15.41 [fase nocturna], $p < 0.05$). Os episódios do tipo SWS também diminuíram embora apenas durante a fase diurna (367.33 ± 64.31 para 195.21 ± 15.23 [fase diurna], $p < 0.05$). Estas alterações não foram acompanhadas por alterações na duração média individual de cada episódio do tipo WK e SWS. Durante a fase diurna foi ainda observado um aumento do número de episódios do tipo M (10.80 ± 1.10 para 21.60 ± 6.80 [fase diurna], $p < 0.05$). Por outro lado, os episódios do tipo REM foram os únicos a apresentar um aumento da sua duração média individual para a fase nocturna (22.70 ± 8.71 para 46.10 ± 10.11 seg. [fase nocturna], $p < 0.05$). Esta alteração não foi acompanhada por um aumento do número de episódios do tipo REM nessa fase. Os restantes estados não apresentaram alterações no número de episódios e duração média individual durante o período de dor.

Na análise individual dos sinais de SI (Figura 3.2.3.2., histogramas da linha central) foi observada uma diminuição do número de episódios do tipo WK e SWS (339.80 ± 48.71 para 259.41 ± 41.32 [fase diurna]; 345.11 ± 64.79 para 187.01 ± 56.77 [fase diurna], $p < 0.05$) e um aumento dos episódios do tipo M (10.81 ± 1.20 para 20.64 ± 2.22 [fase diurna], $p < 0.05$). Estas alterações tiveram lugar durante a fase diurna de registo, não sendo acompanhadas por alterações na duração média de cada episódio. Na análise dos sinais do núcleo VPL (Figura 3.2.3.2., histogramas da linha inferior) apenas os episódios do tipo SWS revelaram uma diminuição significativa durante o período nocturno (324.80 ± 63.21 para

Capítulo III – Resultados

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neurais

227.78 ± 22.31 [fase nocturna], $p < 0.05$). Estas alterações não foram acompanhadas por alterações da duração média de cada episódio.

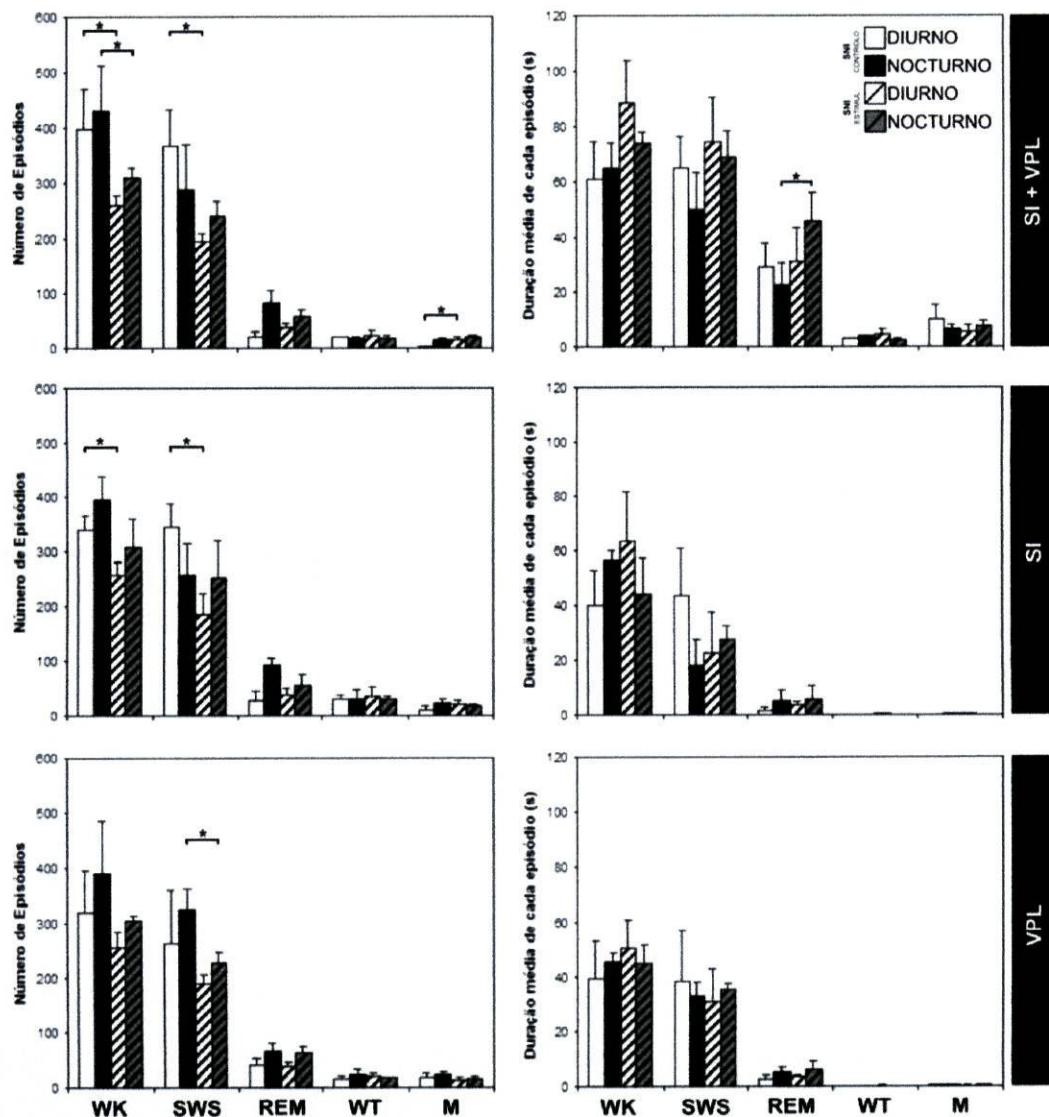


Figura 3.2.3.2. – Número total de episódios e duração média de cada episódio por registo neuronal (24 horas divididas em 12/12 horas de fase diurna e nocturna). WK, estado de vigília; SWS, estado “slow-wave-sleep”; REM, estado “rapid-eye-movement”, WT, oscilação das vibrissas “whisker-twitching”; M, movimento indefinido. Dados referentes ao processamento em conjunto dos canais de LFPs registados em SI e VPL (histogramas da linha superior). Canais de LFPs de SI (histogramas da linha central) e de VPL (histogramas da linha inferior). Comparação efectuada entre o período de controlo e de dor (após cirurgia SNI) para a fase diurna e nocturna de registo. A existência de diferenças significativas foi tidas em conta para valores de probabilidade inferiores a 0.05.

Capítulo III – Resultados

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neurais

O número total de episódios do estado U e a sua duração média individual apresentaram alterações após a implementação do modelo de dor (Figura 3.2.3.3.). Durante a fase diurna de registo foram encontradas alterações significativas para a análise isolada dos canais de LFPs do núcleo VPL. Para esta condição, o número de episódios aumentou (319.01 ± 52.02 para 455.30 ± 23.30 [fase diurna], $p < 0.05$) e a duração média de cada episódio diminuiu (24.20 ± 3.50 para 14.21 ± 1.11 seg. [fase diurna], $p < 0.05$). Durante a fase nocturna foram encontradas alterações para a análise em conjunto dos sinais de SI+VPL (412.3 ± 40.25 para 558.71 ± 39.53 [fase nocturna], $p < 0.05$) e isolada dos canais de SI (437.70 ± 38.90 para 601.51 ± 18.80 [fase nocturna], $p < 0.05$). Estas alterações apenas foram acompanhadas por uma diminuição da duração média individual de cada episódio para a análise em conjunto dos sinais de SI+VPL (22.89 ± 4.60 para 8.80 ± 1.71 seg. [fase nocturna], $p < 0.05$).

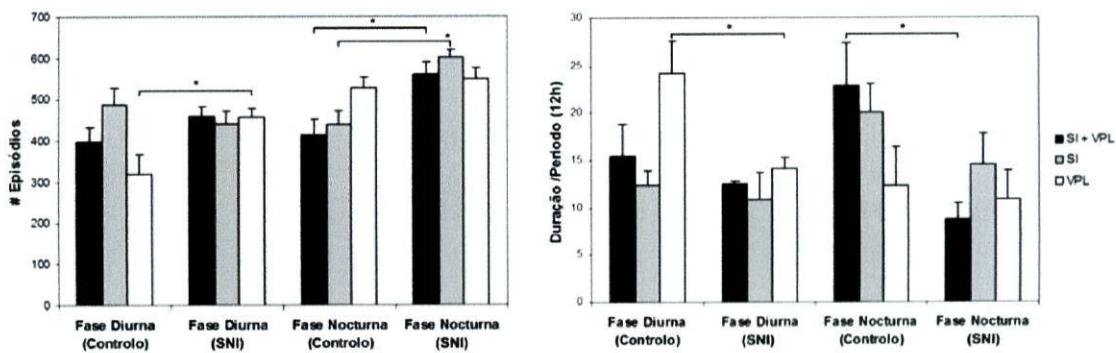


Figura 3.2.3.3. – Número total de episódios do tipo U e duração média de cada episódio por registo neuronal (24 horas divididas em 12/12 horas de fase diurna e nocturna). Dados apresentados para o processamento em conjunto e individual dos canais de LFPs de SI e VPL. Comparação efectuada entre o período de controlo e de dor (após cirurgia SNI) para as fases diurna e nocturna. Os dados revelaram uma tendência global para um aumento do número de episódios do estado U durante o período de dor. Este aumento foi acompanhado por uma diminuição da duração média individual de cada episódio do tipo U. A existência de diferenças significativas foi tida em conta para valores de probabilidade inferiores a 0.05.

3.2.4. TRANSIÇÕES ENTRE ESTADOS DE COMPORTAMENTO NEURONALIS

As transições entre os estados de comportamento foram contabilizadas atendendo a dois critérios de selecção. Em primeiro lugar foram contabilizadas todas as transições directas entre estados (p. e., WK→SWS). Em segundo, para todas as transições mediadas por um estado de transição do tipo “U” (p. e., WK→U→SWS), este estado foi considerado como um prolongamento do estado precedente, ou seja, para o exemplo foi considerada uma transição de WK para SWS. Para a contabilização do número de transições entre estados comportamentais foi implementada uma função em MatLab (função States.m, Anexo A.4.). Esta função importa os hipnogramas dos estados comportamentais gerados pelo algoritmo de Gervasoni et al. (2004) e calcula o número de transições entre os episódios comportamentais aplicando os critérios previamente referidos.

Na tabela 3.2.4. são apresentadas todas as transições possíveis entre os estados comportamentais considerados. Os dados estão agrupados consoante a origem dos sinais de LFPs utilizados para a análise. Processamento em conjunto dos sinais de SI e VPL (Tabela 3.2.4.A.), sinais de SI (Tabela 3.2.4.B.) e de VPL (Tabela 3.2.4.C.).

Capítulo III – Resultados

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais

Tabela 3.2.4. Número médio de transições entre os estados para o período de controlo e de dor (fase diurna e nocturna, 12/12 horas).

A. Dados referentes ao processamento em conjunto dos canais de LFPs registados em simultâneo no córtex somatosensitivo primário (SI) e núcleo talâmico ventro-posterior-lateral (VPL).

			Controlo SNI		SNI	
			Média	EP	Média	EP
Transições (Número/12 Hr)						
WK	SWS	Diurno	120,2	28,9	173	12,1
		Nocturno	115,2	33,3	218,3	30,9
WK	WT	Diurno	1	0,7	8,2	5,1
		Nocturno	3,2	0,6	0,8	0,5
WK	M	Diurno	1,2	0,8	6,8	1,4
		Nocturno	9,2	2,7	9,3	1,7
SWS	WK	Diurno	118	29,4	148,2	14,9
		Nocturno	97	31	183	36,6
SWS	REM	Diurno	8,5	5,3	22,6	5,2
		Nocturno	26	8,6	35,5	7,7
REM	WK	Diurno	8,2	3,9	75	44
		Nocturno	45,7	10,3	44,8	6,6
WT	WK	Diurno	2	0,9	10	4,5
		Nocturno	3,8	0,5	0,8	0,5
WT	M	Diurno	2,7	0,7	8,8	3,3
		Nocturno	5,5	2,3	11,5	4,3
M	WK	Diurno	1,8	1,8	9,6	2,7
		Nocturno	11,5	2,5	14	2,8
M	WT	Diurno	2	0,6	6	1,8
		Nocturno	3,2	0,7	6,8	1,3

Capítulo III – Resultados

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neurais

B. Dados referentes ao processamento apenas dos canais de LFPs registados no córtex SI.

			Controlo SNI		SNI	
			Média	EP	Média	EP
Transições (Número/12 Hr)						
WK	SWS	Diurno	144,8	45,1	167,2	6,1
		Nocturno	103,8	39,6	211,3	56,8
WK	WT	Diurno	12,3	7,6	15,2	11,4
		Nocturno	6,3	4,5	6	3,5
WK	M	Diurno	5,5	5,6	8,7	4,1
		Nocturno	11,7	5	8	1,4
SWS	WK	Diurno	129,2	44,6	149,3	5,9
		Nocturno	97	37,8	193	53,5
SWS	REM	Diurno	14,7	10,1	17,7	7,6
		Nocturno	17	11,2	18,8	13,1
REM	WK	Diurno	16,8	10,6	31,3	12,9
		Nocturno	46,3	19	97	41,6
WT	WK	Diurno	11,7	7,2	14,3	10,3
		Nocturno	5,8	3,8	8,5	6,4
WT	M	Diurno	5	4,7	9,7	6,3
		Nocturno	6,2	3,1	8,5	0
M	WK	Diurno	7	7,7	11,8	0,7
		Nocturno	17,2	6,9	7,5	0,7
M	WT	Diurno	3,7	2,5	6,5	4,2
		Nocturno	6,3	3,6	9	0,7

C. Dados referentes ao processamento apenas dos canais de LFPs registados no núcleo talâmico VPL.

			Controlo SNI		SNI	
			Média	EP	Média	EP
Transições (Número/ 12 Hr)						
WK	SWS	Diurno	66,8	46,0	162,5	17,7
		Nocturno	164,0	23,0	177,9	37,3
WK	WT	Diurno	4,3	3,5	4,0	3,2
		Nocturno	4,7	3,3	3,3	2,8
WK	M	Diurno	11,7	10,0	4,3	2,9
		Nocturno	15,7	3,7	12,8	5,5
SWS	WK	Diurno	58,8	33,5	136,5	11,6
		Nocturno	145,8	19,4	154,1	37,2
SWS	REM	Diurno	15,8	9,0	23,2	11,3
		Nocturno	24,7	20,6	28,5	21,9
REM	WK	Diurno	21,2	15,7	31,2	10,3
		Nocturno	46,2	17,3	46,7	19,1
WT	WK	Diurno	4,7	3,9	4,0	2,7
		Nocturno	3,3	1,8	2,4	2,2
WT	M	Diurno	3,5	1,6	7,5	4,5
		Nocturno	8,3	3,6	8,0	4,0
M	WK	Diurno	11,8	9,3	7,2	5,1
		Nocturno	18,2	5,7	15,1	7,1
M	WT	Diurno	3,7	2,7	4,7	2,2
		Nocturno	5,8	3,9	5,7	3,9

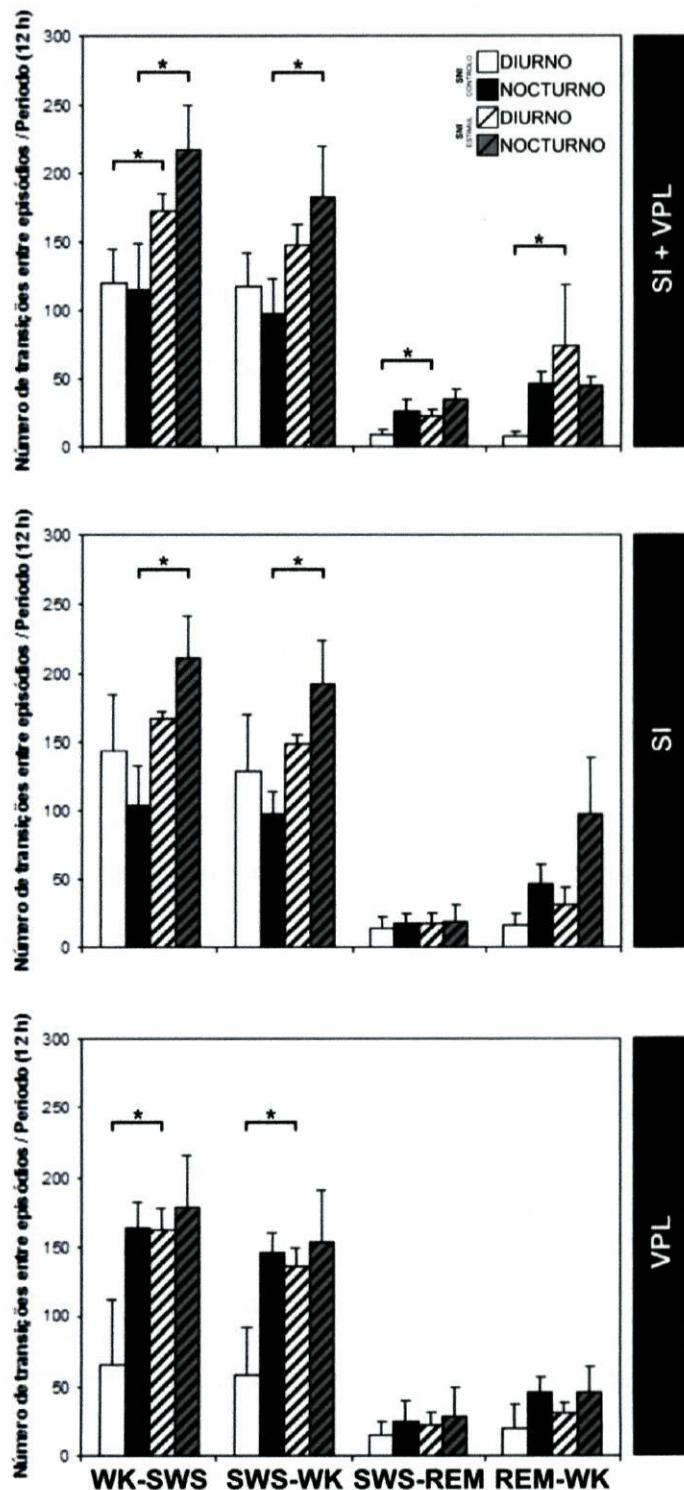


Figura 3.2.4. – Transições mais representativas dos estados. Análise em conjunto dos sinais de LFPs de SI+VPL (histograma superior), análise individual do sinal de SI (histograma central) e de VPL (histograma inferior). Comparação efectuada entre o período de controlo e de dor (após cirurgia SNI). Durante o período de dor foi observado um aumento do número de transições entre estados. Os estados WK e SWS foram os que revelaram um aumento mais significativo. A existência de diferenças significativas foi tida em conta para valores de probabilidade inferiores a 0.05.

Capítulo III – Resultados

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronaais

O número de transições entre os episódios dos estados evidenciaram diferenças significativas entre o período de controlo e de dor. As transições de maior frequência, WK→SWS, SWS→WK, SWS→REM e REM→WK aumentaram durante o período de dor (Figura 3.2.4.).

A análise conjunta das oscilações dos sinais de LFPs registados nas duas áreas do eixo tálamo-cortical (TC) (Figura 3.2.4., histograma superior) revelou um aumento significativo do número de transições entre o estado WK e o estado SWS. Este aumento foi observado durante a fase diurna e nocturna do ciclo circadiano do rato (120.20 ± 28.91 para 173.00 ± 12.1 [fase diurna]; 115.20 ± 33.30 para 218.30 ± 30.90 [fase nocturna], $p < 0.05$). As transições do tipo SWS→REM e REM→WK também aumentaram embora apenas durante a fase diurna após a instalação da condição de dor (8.51 ± 5.31 para 22.68 ± 5.22 [fase diurna]; 8.23 ± 3.91 para 75.00 ± 44.03 [fase diurna], $p < 0.05$). Na fase nocturna, as transições de SWS para WK também sofreram um aumento significativo (97.01 ± 31.10 para 183.33 ± 36.60 [fase nocturna], $p < 0.05$).

Na análise isolada dos canais de LFPs registados no córtex SI (Figura 3.2.4., histograma central), apenas foram observadas alterações significativas nas transições do tipo WK→SWS e SWS→WK durante a fase nocturna de registo (103.87 ± 39.6 para 211.32 ± 56.81 [fase nocturna]; 97.01 ± 37.86 para 193 ± 53.52 [fase nocturna], $p < 0.05$). Por outro lado, a análise isolada dos sinais registados no núcleo VPL (Figura 3.2.4., histograma inferior) apenas revelou existirem diferenças no número de transições do tipo WK→SWS e SWS→WK para a fase diurna de registo neuronal (66.85 ± 46.00 para 162.51 ± 17.70 [fase diurna]; 58.80 ± 33.50 para 136.50 ± 11.60 [fase diurna], $p < 0.05$).

Capítulo IV – Discussão

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais

IV – DISCUSSÃO

4.1. MODELO I - DOR INFLAMATÓRIA

Neste estudo é apresentada a primeira descrição das respostas tálamo-corticais para o modelo de dor inflamatória por injeção periférica de formol em ratos despertos. A tecnologia de registo neuronal por multi-eléctrodos foi aplicada na análise em paralelo da dinâmica populacional de grupos de neurónios e oscilações dos potenciais de campo locais (Nicolelis et al., 1995; 1997). Os dados preliminares foram apresentados por Galhardo et al. (2006) e Cardoso-Cruz et al. (2006a).

Este estudo produziu três descobertas importantes. Primeiro, a existência de um aumento do número de neurónios com actividade correlacionada durante a fase nociceptiva do formol, quando comparada com o período de controlo, sugerindo que as alterações induzidas pelo teste de dor no eixo tálamo-cortical poderão estar associadas a um padrão específico de processamento da informação nociceptiva, nomeadamente num acréscimo da actividade correlacionada entre neurónios. Segundo, a existência de um aumento da densidade espectral de potência dos LFPs dentro da banda de frequência theta (4-9 Hz), simultaneamente na região talâmica e cortical, associado à ocorrência de contrações musculares espontâneas da pata injectada do rato. Estas oscilações dos LFPs permitiram construir um algoritmo de procura semi-automático com a finalidade de prever a ocorrência desse comportamento. Terceiro, o algoritmo implementado para a detecção do momento de execução de cada contração a partir do sinal revelou ser capaz de detectar o comportamento com uma taxa de sucesso de 65 a 70%, para ambas as áreas registadas e protocolos de estimulação.

Alguns trabalhos em ressonância magnética funcional (fMRI) demonstraram que durante a estimulação nociceptiva, múltiplas regiões corticais e subcorticais são activadas (Porro et al., 1991; Logothetis, 2002). Contudo, os métodos actuais de fMRI apresentam-se

limitados ao nível da resolução temporal para a análise de fenómenos nociceptivos de curta duração. Partindo deste pressuposto, a técnica utilizada neste estudo baseada no registo extracelular por multi-eléctrodos embora não permitindo olhar para o cérebro todo em simultâneo como o fMRI, apresenta a vantagem de possibilitar maior resolução temporal e espacial. Por outro lado, actualmente os registos multi-eléctrodo possibilitam a análise em simultâneo da actividade de disparo e potenciais de campo locais de um número elevado de neurónios em animais despertos, representando de uma forma mais fidedigna o funcionamento real do cérebro em situações específicas.

Muita da informação experimental adquirida com multi-eléctrodos na investigação dos mecanismos associados ao processamento doloroso foi obtido a partir de estudos em animais anestesiados (p. e., Galhardo et al., 2002; Monteiro et al., 2006). No entanto, as respostas neuronais evocadas por estimulação dolorosa em condições de anestesia não são idênticas às de animais despertos devido à interferência dos anestésicos na transmissão e descodificação dos sinais dolorosos (Kenshalo et al., 1988; Hutchison et al., 1999). A utilização de animais acordados conjugados com registos multi-eléctrodo tem demonstrado ser uma técnica promissora evitando a desvantagem dos efeitos paralelos da anestesia a nível dos registos neuronais.

O modelo de dor caracterizado pela injecção periférica de formol é frequentemente utilizado como protocolo no estudo da dor de cariz inflamatório (Duboisson and Dennis, 1977; Hunskaar et al., 1985; Abbott et al., 1995; Martindale et al., 2001). É conhecido por produzir uma estimulação longa, com uma resposta nociceptiva comportamental dividida em duas fases distintas. A primeira fase (0-5 min) é iniciada pelas barreiras de fibras C (Martindale et al., 2001), contudo outros investigadores consideram que esta fase do formol é gerada pela actividade a nível das fibras A β e A δ (Puig and Sorkin, 1996; McCall

et al., 1996), assim como pela activação de neurónios convergentes da medula espinhal (Dickenson and Sullivan, 1987a; 1987b; Haley et al., 1990).

A aplicação de lidocaína (um anestésico local) prévia à injecção de formol promove uma inibição da primeira fase do formol não afectando significativamente o aparecimento e desenvolvimento da segunda fase (20-60 min) (Dallel et al., 1995). Por outro lado, se a aplicação de lidocaína for realizada no final da primeira fase do formol produz uma redução das respostas da segunda fase (Puig and Sorkin, 1996). A duração desse bloqueamento está dependente da concentração da dose de lidocaína aplicada (Coderre et al., 1990; Dallel et al., 1995). Estas observações provaram que a segunda fase do formol não está exclusivamente dependente do processo de sensibilização central e que depende também do aumento da actividade dos aferentes primários que ocorre durante a primeira fase (Dallel et al., 1995; McCall et al., 1996). A adicionar a este facto, Puig and Sorkin (1996) provaram existir um aumento da actividade na sensibilidade mecânica das fibras C durante a segunda fase. Todavia, mais recentemente outros investigadores observaram o contrário durante essa fase (Martindale et al., 2001).

Porro et al. (2003) foram os primeiros a defender a existência de uma terceira fase do formol (após 60 min da injecção), na qual existe um declínio da actividade da maior parte das estruturas frontais do cérebro e um aumento da taxa metabólica em regiões responsáveis pelo controlo endógeno da dor. A somar a esse facto, os trabalhos de Huang et al. (2006) demonstraram existir uma alteração do fluxo da informação nociceptiva dos neurónios tálamo-corticais, entre o tálamo e o córtex, a partir do início da terceira fase. A informação nociceptiva no eixo tálamo-cortical é processada em simultâneo com outra informação “irrelevante”. As projecções descendentes do córtex para o tálamo (cortico-talâmicas) são sete a dez vezes maiores do que as projecções ascendentes do tálamo para o córtex (tálamo-corticais) (Bourassa and Deschênes, 1995; Lui and Sandkühler, 1995). As

projecções cortico-talâmicas durante a primeira hora de actividade do formol amplificam a informação nociceptiva ao mesmo tempo que é feita a detecção de estímulos dolorosos e inibem o fluxo de informação ascendente “irrelevante” (Rauschecker, 1998; Suga et al., 2000; Junq et al., 2004). Durante a terceira fase do formol quando existe uma diminuição da quantidade de informação dolorosa ascendente, os *inputs* suprimidos pelas projecções cortico-talâmicas são desmascarados levando a um aumento da quantidade total de informação ascendente entre o tálamo e o córtex (Huang et al., 2006). Estas observações sugeriram que as alterações nos padrões de actividade poderão estar interligados com a emergência de comportamentos de sensibilização central durante a segunda fase do formol (Huang et al., 2006). Por outro lado, os mecanismos associados à diminuição de comportamentos de cariz doloroso no final da segunda fase permanecem ainda pouco claros.

Os resultados previamente apresentados evidenciam uma diminuição do número de contrações musculares espontâneas induzidas pelo formol no final da segunda fase. Diminuições idênticas foram também observadas por alguns investigadores em outros comportamentos nociceptivos, tais como, o lamber da pata injectada (p. e., Porro et al., 2003; Huang et al., 2006), recolher e contrair espontâneo das patas (Jourdan et al., 1997; Almeida et al., 1999). Estas alterações comportamentais coincidem com oscilações observadas na plasticidade funcional das estruturas da região frontal do cérebro na passagem de um padrão EEG de vigilância a um padrão de não vigilância, 50 minutos após a injecção de formol (Ichinose et al., 1999).

Os nossos dados provaram também existir uma modulação do padrão de actividade dos neurónios somato-sensitivos supraespinhais pelo formol. Para os dois protocolos de injecção, a alteração desse padrão foi direcionada para um aumento da excitabilidade. Esta excitabilidade poderá estar ligada a alterações funcionais no fluxo de informação do

tálamo para o córtex durante a fase nociceptiva do formol. A análise temporal da actividade populacional revelou ainda um incremento da coerência funcional entre o tálamo e o córtex após injecção de formol, sugerindo a existência de um padrão específico de processamento da informação nociceptiva. Esta alteração reflectiu-se num aumento número de neurónios com actividade correlacionada entre VPL/VPL, SI/SI e VPL/SI após a injecção de formol. Registos agudos a nível da medula espinhal provaram existir também um acréscimo da actividade neuronal correlacionada durante os períodos de estimulação inócuas após injecção de formol (Galhardo et al., 2002). Este aumento da acuidade táctil de populações de neurónios poderá estar associado à emergência de dor evocada por estímulos inócuos, induzida por alterações na hipersensibilidade mecânica das fibras durante a fase nociceptiva.

Os registos de actividade neuronal revelaram a presença de padrões específicos na janela temporal de execução de cada contração muscular, caracterizando-se por uma resposta predominantemente excitatória. Todavia, ocasionalmente também foram encontradas respostas inibitórias. No que diz respeito à análise do sinal dos LFPs, a injecção de formol aumentou a densidade espectral de potência do sinal na banda de frequência *theta* (4-9 Hz) durante a janela temporal que precede a execução de cada contração. Este aumento revelou ser superior no núcleo talâmico VPL quando comparado com o córtex SI, facto que pode ser explicado devido à região talâmica processar uma maior quantidade de informação. Este padrão de oscilação espectral também foi observado em outras respostas comportamentais do animal induzidas pelo formol, embora não se tenha verificado a existência de correlação temporal entre ambos.

Alguns investigadores têm associado as oscilações proeminentes na banda de frequência 3-12 Hz em roedores, ao condicionamento (Seager et al., 2002), à memória (Givens, 1996; Mandile et al., 2003), ao planeamento de trajectórias (O’Keefe and Recce,

1993), ao movimento (Vanderwolf, 1969), à orientação (Gavrilov et al., 1995) e à exploração (Lengyel et al., 2003). O ritmo *theta* do hipocampo no rato é um dos ritmos biológicos mais bem estudado (Skaggs, 1996). Na literatura, reporta-se ainda o facto do envolvimento do formol na indução de um padrão bifásico na activação do hipocampo na banda *theta*, em registos realizados na região dorsal das camadas das células piramidais em ratos anestesiados (Khanna, 1997) e despertos (Tai et al., 2006). O ritmo *theta* surge também associado a comportamentos exploratórios como a locomoção, o cheirar, a orientação e também durante o estado *rapid-eye-movement* (REM).

A nossa hipótese endereça a possível ligação do aumento da densidade espectral de potência observado na banda *theta* dos LFPs durante o período prévio de cada contração muscular ao processamento da informação nociceptiva. Estas oscilações do sinal foram utilizadas para prever a ocorrência deste comportamento, funcionando indirectamente como um sensor na detecção de picos de dor espontânea. Na literatura é sugerido que este tipo de contrações espontâneas são um reflexo de picos isolados de dor resultantes de um aumento da excitabilidade das vias do sistema somato-sensitivo (Coderre et al., 1990; 1993). Por outro lado, a actividade dos neurónios e as oscilações na potência do sinal dos LFPs, inicia-se com uma latência temporal de 250-500 mseg. à contração muscular observada, indicando que este comportamento é precedido por um processamento talâmico e cortical. Este facto sugere o envolvimento de mecanismos com génese central de cariz descendente.

O conhecimento das oscilações neuroniais associadas a flutuações do nível de excitabilidade nas áreas registadas, apresenta-se como uma base importante para a implementação de estratégias para o alívio e libertação de mecanismos transdutores de dor espontânea. Nomeadamente, através da implementação de sistemas para micro-estimulação neuronal pontual controlados por *feedback*. Na literatura desde os anos 50 encontram-se

estudos terapêuticos baseados na estimulação de áreas específicas do cérebro e medula espinhal para libertação da sensação de dor (ver como revisão, Tsubokawa et al., 1991; Kumar et al., 1997; Leone, 2006). A nível do córtex motor têm sido utilizados implantes para estimulação crónica no tratamento de dor central e neuropática (Tsubokawa et al., 1991; Nguyen et al., 1999; Hooper et al., 2002; Franzini et al., 2003). Este tipo de implantes é o último recurso em pacientes que desenvolveram resistência à morfina e sensibilidade a barbitúricos. Contudo, a sua implementação apresenta também algumas desvantagens, as quais na maior parte dos casos resultam de complicações associadas ao processo cirúrgico de implantação (p. e., desenvolvimento de hematomas epidurais, infecções subcutâneas na região do implante, etc.). Outro problema é o nível de eficiência entre pacientes que varia com as alterações de plasticidade central decorrentes da evolução das lesões periféricas. Para além destes sistemas têm também sido utilizados micro-estimuladores hipo-talâmicos colocados em vários centros para redução do nível de dor por neuromodulação central (Leone, 2006; Leone et al., 2006). A nível clínico na medula espinhal já são utilizados há alguns anos eléctrodos subcutâneos para estimulação da micro-circulação, alívio da dor e actividade motora em pacientes com isquémia crónica nas extremidades anteriores e posteriores (Simpson, 1999; Simpson and Ward, 2004). Estes sistemas são caracterizados por programas de estimulação contínua ou pontual, com pulsos de comprimento de onda pequeno, frequência e tensão relativamente elevadas. Um dos problemas associados à aplicação deste tipo de estimuladores e talvez o mais importante é a eficiência a longo prazo devido à instalação de mecanismos centrais de habituação ao tipo de estímulo. Por outro lado, a maior parte destes dispositivos não apresenta mecanismos de *feedback*, o que impossibilita que as estimulações apenas sejam efectuadas quando necessário.

Capítulo IV – Discussão*As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais*

Em conclusão, as oscilações na banda de frequência *theta* observadas durante a janela de tempo que precede as contrações musculares sugeriram a sua estreita associação com flutuações do nível de dor, nomeadamente no desenvolvimento de picos isolados de dor espontânea (Cardoso-Cruz et al., 2006a; Galhardo et al., 2006). O conhecimento dos padrões de oscilação neuronal associados a este tipo de resposta comportamental nociceptiva poderá ser utilizado para o desenvolvimento de sistemas de micro-estimulação controlados por *feedback* para a atenuação deste tipo de sintomatologia.

4.2. MODELO II – DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA

Nesta parte do estudo é apresentada a primeira descrição das alterações dos padrões de LFPs ao longo do ciclo circadiano do rato com o modelo de dor neuropática SNI. Os padrões de actividade neuronal foram analisados através de registo de LFPs de longa duração a nível do córtex SI e núcleo talâmico VPL. Os resultados preliminares foram apresentados por Cardoso-Cruz et al. (2007).

Através da análise dos resultados experimentais foram retiradas três observações importantes. Em primeiro lugar, os ratos durante o período de dor apresentaram uma redução do tempo dispensado no estado *slow-wave-sleep* (SWS) na fase diurna (fase de sono do rato) e um aumento do estado de U em ambas as fases de registo. No entanto, para o estado WK não foram encontradas alterações, ao contrário do que foi descrito a nível de outros modelos de dor crónica que revelaram um aumento da percentagem de tempo dispensado neste estado durante o período de dor (modelo do formol, Carli et al., 1987; modelo do CFA, Landis et al., 1988; 1989; modelo do CCI, Monassi et al., 2003; Andersen and Tufik, 2003; Keay et al., 2004). Na maior parte dos estudos encontrados na literatura reporta-se ainda uma diminuição do estado SWS à semelhança do que acontece com o modelo SNI (Carli et al., 1987; Landis et al., 1988; 1989; Andersen and Tufik, 2003; Monassi et al., 2003; Keay et al., 2004). Por outro lado, à semelhança do observado por Monassi et al. (2003) e Keay et al. (2004) com o modelo de dor CCI, os nossos resultados não revelaram alterações no estado REM. Alguns investigadores observaram diminuições da percentagem de tempo dispensado neste estado (Carli et al., 1987; Landis et al., 1989) e por outros um aumento (Andersen and Tufik, 2003; Schütz and Tufik, 2003).

Em segundo lugar, os estados WK e SWS apresentaram uma diminuição do número de episódios e a duração média de cada episódio não se alterou durante o período de dor.

Estes resultados podem ser explicados por um aumento significativo do número de episódios do estado U e por uma redução da duração média de cada episódio durante esse período. Dados publicados a nível de outros modelos de dor revelaram observações diferentes. Landis et al. (1988) em ratos artríticos observaram um aumento acentuado da fragmentação do sono associado a um aumento do número de episódios dos estados WK e SWS e uma diminuição da sua duração média individual. Em outro trabalho do mesmo grupo foram registados aumentos significativos do tempo dispensado no estado de vigília, um aumento do número de transições para o estado *light* SWS de baixa amplitude e uma redução das transições para o estado *deep* SWS de alta amplitude e estado REM. Os ratos apresentaram ainda uma diminuição generalizada da amplitude do padrão EEG (Landis et al., 1989). Com o modelo inflamatório orofacial de dor crónica, Schütz e Tufik (2003) observaram um aumento do número de episódios e uma diminuição da sua duração média individual para o estado WK durante as fases diurna e nocturna. Paralelamente, os estados SWS e REM apresentaram uma diminuição do número de episódios em ambas as fases de registo. Contudo, apenas no estado REM foi observado uma redução da duração média individual de cada episódio.

Em último lugar, o número de transições entre os estados WK, SWS e REM sofreu um aumento significativo durante o período de dor. Esta alteração poderá estar igualmente associada a um aumento do número de episódios do estado U. Por outro lado, contrariamente a outros modelos de dor, este aumento não foi acompanhado por um acréscimo do número de episódios dos estados em questão. Este facto pode ser explicado por uma diminuição do número de transições entre estes estados comportamentais e outros de menor frequência no ciclo circadiano. Este acréscimo das transições entre episódios comportamentais sugere a presença de uma degradação da estrutura do ciclo circadiano.

Capítulo IV – Discussão

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

Resultados similares foram observados em diversos quadros clínicos de dor crónica (Lautenbacher et al., 2006).

Alguns modelos teóricos tentam mimetizar as transições possíveis entre os estados comportamentais WK, SWS e REM (Bazhenov et al., 2002; Comte et al., 2006). Estes modelos apoiam-se em observações experimentais para a previsão a longo prazo de alterações a nível da estrutura do ritmo circadiano. Na literatura encontra-se ainda a descrição de um estado de transição de curta duração denominado por *transition state* (TS) que ocorre esporadicamente na passagem de um padrão SWS a REM. Esta classe de episódios foi descrita pela primeira vez no rato (Gottesman, 1992; Benington et al., 1994) e em outros mamíferos (McCarley and Hobson, 1970; Glin et al., 1991). Recentemente, Mandile et al. utilizando métodos computacionais de alta resolução para a análise de padrões EEG identificaram também este tipo de oscilação na transição de SWS→TS→WK embora com uma duração superior à observada na transição SWS→TS→REM (Mandile et al., 2000; Piscopo et al., 2001a; 2001b; Mandile et al., 2003). O estado TS quando associado a sequências de episódios de sono do tipo (SWS→TS→REM) revelou estar correlacionado com a capacidade de aprendizagem de tarefas comportamentais no rato. Por outro lado, as transições SWS→REM quando não associadas com o estado de transição TS evidenciaram estar apenas correlacionadas com a retenção de respostas inatas como comer, beber, etc. (Vescia et al., 1996; Mandile et al., 2000; Piscopo et al., 2001b; Mandile et al., 2003).

Na literatura encontram-se diversos estudos que abordam a interacção entre a dor e as perturbações no ciclo circadiano, tanto em humanos (Moldofsky and Scarisbrick, 1976; Lentz et al., 1999; Means et al., 2000; Porreca et al., 2002; Lautenbacher et al., 2006) como em modelos animais (Carli et al., 1987; Landis et al., 1988; Onen et al., 2001; Andensen and Tufik, 2003; Kontinen et al., 2003; Mendelson et al., 2003; Monassi et al., 2003;

Schütz and Tufik, 2003; Keay et al., 2004; Millecamps et al., 2005). No entanto, a forma pela qual os mecanismos associados a distúrbios do sono podem influenciar a percepção da dor continuam até à data ainda pouco estudados. É conhecido o envolvimento de algumas das estruturas cerebrais associadas ao sono na percepção da dor, como o núcleo noradrenérgico *coeruleus* e o núcleo serotoninérgico *raphe* (Pertovaara and Almeida, 2006; McCarley, 2007). Na literatura encontram-se alguns trabalhos que abordam a associação de estados de privação do sono e oscilações na sensibilidade à dor. Estudos clínicos em humanos revelaram que o nível de sensibilidade à dor aumenta em patologias associadas à privação do sono (Moldofsky and Scarisbrick, 1976; Drewes et al., 1998; Lentz et al., 1999; Kundermann et al., 2004a; 2004b; Lautenbacher et al., 2006). Exemplo disso são pacientes com distúrbios de sono que na presença de lesões periféricas revelam alterações do sistema regulatório da dor levando a exacerbações dos sintomas dolorosos decorrentes das lesões (Porreca et al., 2002). Estudos em modelos animais ilustram o envolvimento da privação do estado REM na diminuição do limiar necessário para a percepção de dor (Hicks and Sawrey, 1978; Onen et al., 2001; Wei et al., 2007). A privação do estado REM tem sido associado à diminuição da actividade de receptores opióides endógenos nomeadamente MU e delta (Fadda et al., 1991; Wei et al., 2007), alterações nas propriedades anti-nociceptivas (Ukponmwan et al., 1984; Ukponmwan and Dzoljic, 1984) e inibição da síntese de péptidos (Shapiro and Girdwood, 1981). Na literatura existem alguns estudos comprovam o envolvimento dos neurónios serotoninérgicos no controlo da dor e mecanismos associados ao estado REM (McCarley et al., 1995; McCarley, 2007; Wei et al., 2007).

Neste estudo é feita a primeira análise das alterações no ciclo circadiano do rato induzidas pelo modelo de dor neuropática SNI. No entanto, na literatura encontram-se também estudos baseados em outros modelos de dor, p. e. por constrição crónica do nervo

Capítulo IV – Discussão

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

ciático (CCI) (Andersen and Tufik, 2003; Kontinen et al., 2003; Monassi et al., 2003; Keay et al., 2004), por indução de artrite crónica pela injecção do complexo adjuvante de Freund (CFA) (Landis et al., 1988; 1989; Schütz and Tufik, 2003; Millecamps et al., 2005) e por injecção periférica de formol (Carli et al., 1987). A maior parte destes estudos limita-se à análise do comportamento e/ou a registos de EEG/EMG em intervalos de curtos de tempo durante a fase diurna e nocturna do ciclo, extrapolando os resultados para o tempo restante (Landis et al., 1988; 1989; Kontinen et al., 2003). Uma das desvantagens associadas deste tipo de abordagem surge devido ao facto de não se abranger o ciclo completo podendo os extremos de vigilância ser enfatizados e confundidos com outros factores do ritmo circadiano. Por outro lado, ainda pouco se sabe sobre a fisiopatologia associada às disfunções no ritmo circadiano causadas em condições de dor crónica, em parte devido ao número limitado de modelos experimentais para o seu estudo. O desenvolvimento de modelos experimentais pode aportar mais informações acerca dos mecanismos envolvidos neste tipo de alterações, nomeadamente de forma a testar a eficácia de novos fármacos para o seu combate.

Em conclusão, com o modelo de dor neuropática SNI foram observadas alterações no ritmo circadiano do rato nomeadamente a nível do tempo dispensado, número de episódios e transições entre estados comportamentais. Por outro lado, o aumento significativo do tempo dispensado e número de episódios do estado de transição U sugeriu a sua estreita associação com a instalação da condição de dor.

Capítulo V – Considerações Finais

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neurais

V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Capítulo V – Considerações Finais

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

O presente trabalho experimental foi desenvolvido em três fases. Na primeira fase os esforços foram direcionados para o desenho, construção e optimização das matrizes de multi-eléctrodos para registo da actividade neuronal. Na segunda fase foi optimizado todo o processo micro-cirúrgico subjacente à implantação crónica das matrizes de micro-eléctrodos no córtex somato-sensitivo primário e núcleo talâmico ventro-posterior-lateral. Por último, depois de terem sido reunidas todas as condições técnicas para o registo dos sinais neuronais procedeu-se à análise dos objectivos propostos.

Durante esta tese foram analisados os padrões neuronais no eixo tálamo-cortical relativos ao processamento doloroso implementando dois modelos animais de dor persistente. O primeiro modelo de dor baseado na injecção periférica de formol foi seleccionado por os animais manifestarem comportamentos nociceptivos específicos facilmente quantificáveis. Dentro deste tipo de manifestações comportamentais encontram-se as contrações musculares espontâneas da pata injectada, que se pensa serem devidas a picos espontâneos de dor. Partindo deste pressuposto pretendeu-se estudar os padrões de actividade neuronal na janela temporal sobreponível à ocorrência de das contrações. Na análise dos registos neuronais foram observados picos na densidade espectral de potência do sinal dos LFPs tálamo-corticais na banda de frequência *theta* (4-9 Hz). Estas oscilações demonstraram estar correlacionadas com o tempo de execução das contrações musculares, ocorrendo numa janela temporal de 250 a 500 mseg prévia à contração. Tendo como base estes padrões de oscilação foi construído um algoritmo capaz de prever o tempo de manifestação de cada contração mediante a análise do sinal neuronal. Através da comparação dos tempos previstos pelo algoritmo com os tempos observados nos registos

comportamentais em vídeo, o algoritmo implementado revelou uma elevada percentagem de acerto na detecção de contrações espontâneas.

O conhecimento deste tipo de padrões pode ter um interesse especial, nomeadamente para o desenvolvimento de sistemas de micro-estimulação cerebral controlados pelo *feedback* da actividade neuronal, de forma a aumentar a sua eficácia a longo-prazo na atenuação deste tipo de sintomatologia dolorosa.

Na segunda parte experimental desta tese foi utilizado um modelo de dor crónica neuropática periférica. O modelo aplicado apresenta a vantagem de ser baseado na neuropatia do nervo ciático, sendo por isso ideal para a transposição e comparação com dados clínicos. Por outro lado, com este modelo pretendeu-se realizar registos neuronais de longa-duração o que possibilitou a análise das alterações decorrentes da evolução de uma condição de dor crónica nomeadamente a nível do ritmo circadiano do rato.

Na literatura encontram-se diversos estudos que abordam a interacção entre a dor e as perturbações do ciclo circadiano. No entanto, a forma pela qual os mecanismos associados a distúrbios do sono podem influenciar a percepção da dor e vice-versa continuam até à data ainda pouco estudados. É reconhecido, principalmente através de estudos clínicos que estados de privação do sono desencadeiam alterações na sensibilidade à dor. No entanto, as abordagens a nível de modelos animais para o estudo deste tipo de condições é escassa.

Com este modelo de dor foram observadas alterações importantes no ritmo circadiano do rato, entre as quais se destacam alterações na duração, episódios e transições dos estados comportamentais. Os resultados obtidos sugeriram uma degradação da estrutura do ciclo circadiano do rato induzida pela instalação da condição de dor.

Capítulo V – Considerações Finais

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

No decorrer da preparação deste trabalho deparamo-nos com diversos problemas interessantes, alguns foram abordados por nós outros não, sendo assim deixamos aqui alguns tópicos que são susceptíveis de serem aprofundados.

Muito embora grande parte do trabalho realizado nesta tese se tenha centrado no estudo do processamento da informação nociceptiva a nível da via lateral do eixo tálamo-cortical, seria interessante avaliar o funcionamento em paralelo da via medial que se pensa estar dedicada aos aspectos afecto-motivacionais da dor, nomeadamente a nível dos núcleos do tálamo medial e de algumas estruturas do sistema límbico e associativo (p.e., hipocampo, córtex cingulado e amígdala). Embora a maior parte das abordagens terapêuticas sejam direcionadas para a via lateral de processamento da dor, considera-se actualmente que a via medial apresenta um papel mais importante no processamento nociceptivo do que a via lateral.

Algo que também nos parece importante seria abordar a implementação de outros modelos animais de dor crónica, aplicando as técnicas de registo neuronal e de análise de dados utilizadas no decorrer desta tese.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas
As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais

VI – REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

Capítulo VI – Referências Bibliográficas

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

ABBOTT, F. V., Franklin, K. B. J., Westbrook, R. F. (1995) *The Formalin Test - Scoring Properties of the First and 2Nd Phases of the Pain Response in Rats*. Pain 60: 91-102.

ABELES, M. (1982) *Quantification, smoothing, and confidence limits for single units' histograms*. J Neurosci Methods 5: 317-325.

ACHERMANN, P., Borbély, A. A. (1997) *Low-frequency (<1 Hz) oscillations in the human sleep electroencephalogram*. Neuroscience 81: 213-222.

ALITTO, H. J., Usrey, W. M. (2003) *Corticothalamic feedback and sensory processing*. Curr. Opin. Neurobiol. 13(4):440-445.

ALMEIDA, A., Storkson, R., Lima, D., Hole, K., Tjolsen, A. (1999) *The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat*. Eur J Neurosci 11: 110-122.

ANDERSEN, M. L., Tufik, S. (2003) *Sleep patterns over 21-day period in rats with chronic constriction of sciatic nerve*. Brain Research 984, 84-92.

BALIKI, M., Al-Amin, H. A., Atweh, S. F., Jaber, M., Hawwa, N., Jabbur, S. J., Apkarian, A. V., Saadé, N. E. (2003) *Attenuation of neuropathic manifestations by local block of the activities of the ventrolateral orbito-frontal area in the rat*. Neuroscience 120(4):1093-1104.

BAZHENOV, M., Timofeev, I., Steriade, M., and Sejnowski, T. J. (2002) *Model of thalamocortical slow-wave-sleep oscillations and transitions to activated states*. Journal of Neuroscience 22[19], 8691-8704.

BELMONTE, C., Cervero, F. (1996) *Neurobiology of Nociceptors*. Oxford Press.

BENINGTON, J. H., Kodali, S. K., and Heller, H. C. (1994) *Scoring transitions to REM sleep in rats based on the EEG phenomena of preREM sleep: an improved analysis of sleep structure*. Sleep 17, 28-36.

BENNETT, G. J. (1994) *Neuropathic Pain*. In: *Textbook of pain*. In: *Textbook of Pain* (Wall PD, Melzack R, eds), pp 201-224. Edinburgh: Churchill Livingstone.

BENNETT, G. J., Xie, Y. K. (1988) *A peripheral mononeuropathy in rat produces disorders of pain sensation like those seen on man*. Pain 33: 87-107.

BOURASSA, J., Deschênes, M. (1995) *Corticothalamic projections from the primary visual cortex in rats: a single fiber study using biocytin as an anterograde tracer*. Neuroscience 66[2], 253-263.

BOURQUIN, A. F., Suveges, M., Pertin, M., Gilliard, N., Sardy, S., Davison, A. C., Spahn, D. R., Decosterd, I. (2006) *Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse*. Pain 122: 1-14.

CARDOSO-CRUZ, H., Lima, D., Galhardo, V. (2006a) *Thalamocortical pain processing in freely behaving rats: A study based on chronic extracellular multichannel recordings*. Eur J Pain 10: S54-S55.

CARDOSO-CRUZ, H., Mendonça, L., Lima, D., Galhardo, V. (2006b) *Microsurgical implantation of chronic multielectrodes for neuronal recording of thalamocortical pain processing in freely*

Capítulo VI – Referências Bibliográficas
As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais

behaving rats. Microcirurgia - 11.º Curso Prático. Centro de Actualização da Formação Técnica. Campus Agrário de Vairão. 28 a 30 de Junho de 2006.

CARDOSO-CRUZ, H., Aguiar, P., Lima, D., Galhardo, V. (2007) *Thalamocortical global dynamics of behavioral transitions in a rat model of persistent peripheral neuropathic pain.* X Reunião Annual da Sociedade Portuguesa de Neurociências. 2007, 24-26 Maio, Ofir, Portugal.

CARLI, G., Montesano, A., Rapezzi, S., and Paluffi, G. (1987) *Differential effects of persistent nociceptive stimulation on sleep stages.* Behav. Brain Res. 26[2-3], 89-98.

CASEY, K. L., Minoshima, S., Morrow, T. J., Koeppe, R. A. (1996) *Comparison of human cerebral activation patterns during cutaneous warmth, heat pain, and deep cold pain.* J Neurophysiol 76: 571-581.

CASTRO-ALAMANCOS, M. (2004) *Dynamics of sensory thalamocortical synaptic networks during information processing states.* Prog Neurobiol 74: 213-247.

CODERRE, T. J., Katz, J., Vaccarino, A. L., Melzack, R. (1993) *Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence.* Pain 52: 259-285.

CODERRE, T. J., Vaccarino, A. L., Melzack, R. (1990) *Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection.* Brain Res 535: 155-158.

COMTE, J. C., Schatzman, M., Ravassard, P., Luppi, P. H., and Salin, P. A. (2006) *A three states sleep-waking model.* Chaos, Solitons and Fractals 29, 808-815.

CRAIG, A. D., (2004) *Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic lamina I terminations in the macaque monkey.* J. Comp. Neurol. 477(2):119-148.

CRAIG, A. D., Dostrovsky, J. O. (1991) *Thermoreceptive lamina I trigeminothalamic neurons project to the nucleus submedius in the cat.* Exp. Brain Res. 85:470-474.

DALLEL, R., Raboisson, P., Clavelou, P., Saade, M., Woda, A. (1995) *Evidence for A Peripheral Origin of the Tonic Nociceptive Response to Subcutaneous Formalin.* Pain 61: 11-16.

DAVIS, K. D., Kwan, C. L., Crawley, A. P., Mikulis, D. J. (1998) *Functional MRI study of thalamic and cortical activations evoked by cutaneous heat, cold and tactile stimuli.* J Neurophysiol 80: 1533-1546.

DECOSTERD I., Woolf, C. J. (2000) *Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain.* Pain 87: 149-158.

DESTEXHE, A., Contreras, D., Steriade, M. (1999) *Spatiotemporal analysis of local field potentials and unit discharges in cat cerebral cortex during natural wake and sleep states.* J Neurosci 19: 4595-4608.

DICKENSON, A., Sullivan, A. F. (1987a) *Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of rat deep dorsal horn nociceptive neurons in the rat.* Neuropharmacol 26: 1235-1238.

DICKENSON, A., Sullivan, A. F. (1987b) *Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin.* Pain 30: 349-360.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

DREWES, A. M., Svendsen, L., Taagholt, S. J., Bjerregard, K., Nielsen, K. D., Hansen, B. (1998) *Sleep in rheumatoid arthritis: A comparison with healthy subjects and studies of sleep/wake interactions*. British Journal of Rheumatology 37: 71-81.

DUBNER, R., Ruda, M. A. (1992) *Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation*. Trends Neurosci 15: 96-103.

DUBOISSON, D., Dennis, S. G. (1977) *The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats*. Pain 4: 161-174.

EIDE, P. K. (1998) *Pathophysiological mechanisms of central neuropathic after spinal cord injury*. Spinal Cord 36[9], 601-612.

FADDA, P., Tortorella, A., Fratta, W. (1991) *Sleep-Deprivation Decreases Mu and Delta Opioid Receptor-Binding in the Rat Limbic System*. Neurosci Lett 129: 315-317.

FANSELOW, E. E., Nicolelis, M. A . L. (1999) *Behavioral modulation of tactile responses in the rat somatosensory system*. J Neurosci 19: 7603-7616.

FANSELOW, E. E., Sameshima, K., Baccala, L. A., Nicolelis, M. A. L. (2001) *Thalamic bursting in rats during different awake behavioral states*. Proc Natl Acad Sci USA 98: 15330-15335.

FRANZINI, A., Ferroli, P., Dones, I., Marras, C., and Broggi, G. (2003) *Chronic motor cortex stimulation for movement disorders: a promising perspective*. Neurol Res 25[2], 123-126.

FUKUOKA, T., Tokunaga, A., Kondo, E., Miki, K., Tachibana, T., and Noguchi, K. (1998) *Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA(A) receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model*. Pain 78[1]:13-26.

GALHARDO, V., Apkarian, A. V., Lima, D. (2002) *Peripheral inflammation increases the functional coherency of spinal responses to tactile but not nociceptive stimulation*. J Neurophysiol 88: 2096-2103.

GALHARDO, V., Cardoso-Cruz, H., and Lima, D. (2006) *Dynamics of thalamocortical oscillations in pain processing induced by peripheral formalin injection: A multielectrode study in freely behaving rats*. 5th Forum of European Neuroscience Society (FENS), July 8-12 2006 Vienna Austria FENS Abstr. A003. 7.

GAVRILOV, V. V., Wiener, S. I., and Berthoz, A. (1995) *Enhanced hippocampal theta EEG during whole body rotations in awake restrained rats*. Neurosci Lett 197[3], 239-241.

GERVASONI, D., Lin, S-C., Ribeiro, S., Soares, E. S., Pantoja, J., and Nicolelis, M. A. L. (2004) *Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions*. Journal of Neuroscience 24[49], 11137-11147.

GIVENS, B. (1996) *Stimulus-evoked resetting of the dentate theta rhythm: relation to working memory*. NeuroReport 8, 159-163.

GLIN, L., Arnaud, C., Berracochea, D., Galey, D., Jaffard, R., and Gottesman, C. (1991) *The intermediate stage of sleep in mice*. Physiol Behav 50, 951-953.

GOTTESMAN, C. (1992) *Detection of seven sleep-waking stages in the rat*. Neurosci Biobehav Rev 16, 31-38.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas
As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais

- GUIDO, W., Weyand, T. (1995) *Burst Responses in Thalamic Relay Cells of the Awake Behaving Cat*. J Neurophysiol 74: 1782-1786.
- HALEY, J. E., Sullivan, A. F., Dickenson, A. H. (1990) *Evidence for Spinal N-Methyl-D-Aspartate Receptor Involvement in Prolonged Chemical Nociception in the Rat*. Brain Res 518: 218-226.
- HICKS, R. A., Sawrey, J. M. (1978) *Rem-Sleep Deprivation and Stress Susceptibility in Rats*. Psychological Record 28: 187-191.
- HOOPER, J., Taylor, R., Pentland, B., and Whittle, I. R. (2002) *A prospective study of thalamic deep brain stimulation for the treatment of movement disorders in multiple sclerosis*. Br J Neurosurg 16[2], 102-109.
- HSU, M.-M., Shyu, B.-C. (1997) *Electrophysiological study of the connection between medial thalamus and anterior cingulate cortex in the rat*. NeuroReport 8: 2701-2707.
- HUANG, J., Chang, J-Y., Woodward, D. J., Baccala, L. A., Han, J-S., Wang, J-Y., Luo, F. (2006) *Dynamic neuronal responses in cortical and thalamic areas during different phases of formalin test in rats*. Exp Neurol 200: 124-134.
- HUBEL, D. H., Wiesel, T. N. (1998) *Early exploration of the visual cortex*. Neuron 20: 401-412.
- HUNSKAAR, S., Fasmer, O. B., Hole, K. (1985) *Formalin Test in Mice, A Useful Technique for Evaluating Mild Analgesics*. J Neurosci Methods 14: 69-76.
- HUTCHISON, W. D., Davis, K. D., Lozano, A. M., Tasker, R. R., Dostrovsky, J. O. (1999) *Pain-related neurons in the human cingulate cortex*. Nature Neurosci 2: 403-405.
- ICHINOSE, F., Miyazaki, M., Goto, T., Takahashi, H., Terui, K., Niimi, Y., Uezono, S., Morita, S., Yanagida, H. (1999) *Electroencephalographic responses to the formalin test in rats*. Pain 80: 251-256.
- JONES, E. G., Pons, T. P. (1998) *Thalamic and brainstem contributions to large-scale plasticity of primate somatosensory cortex*. Science 282: 1121-1125.
- JOURDAN, D., Ardid, D., Bardin, L., Bardin, M., Neuzeret, D., Lanphouthacoul, L., Eschalier, A. (1997) *A new automated method of pain scoring in the formalin test in rats*. Pain 71: 265-270.
- JUERGENS, E., Guettler, A., Eckhorn, R. (1999) *Visual stimulation elicits locked and induced gamma oscillations in monkey intracortical- and EEG-potentials, but not in human EEG*. Exp Brain Res 129: 247-259.
- JUNQ, S. C., Kim, J. H., Choi, I. S., Cho, J. H., Bae, Y. C., Lee, M. G., Shin, H. C., and Choi, B. J. (2004) *Corticothalamic modulation on formalin-induced change of VPM thalamic activities*. NeuroReport 15[9], 1405-1408.
- KANDEL, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (2000) *Principles of Neural Science*, 4th ed., pp.472-479. New York: McGraw-Hill.
- KEAY, K. A., Monassi, C. R., Levison, D. B., and Bandler, R. (2004) *Peripheral nerve injury evokes disabilities and sensory dysfunction in a subpopulation of rats: a closer model to human chronic neuropathic pain?* Neuroscience Letters 361, 188-191.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

KENSHALO, D. R., Chudler, E. H., Anton, F., Dubner, R. (1988) *SI nociceptive neurons participate in the encoding process by which monkeys perceive the intensity of noxious thermal stimulation.* Brain Res 454: 378-382.

KHANNA, S. (1997) *Dorsal hippocampal field CA1 pyramidal cell responses to a persistent versus an acute nociceptive stimulus and their septal modulation.* Neuroscience 77, 713-721.

KIM, J. S. (2007) *Patterns of sensory abnormality in cortical stroke: evidence for a dichotomized sensory system.* Neurology. 68[3], 174-180.

KIM, S. H., Chung, J. M. (1992) *An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat.* Pain 50: 355-363.

KOLTZENBURG, M. (1998) *Painful neurophathies.* Curr Op Neurobiol 11: 515-521.

KONTINEN, V. K., Ahnaou, A., H.I.M., W., and Meert, T. F. (2003) *Sleep and EEG patterns in the chronic constriction injury model of neuropathic pain.* Physiology & Behavior 78, 241-246.

KÜHN, A. A., Kupsch, A., Schneider, G.-H., Brown, P. (2006) *Reduction in subthalamic 8-35 Hz oscillatory activity correlates with clinical improvement in Parkinson's disease.* Eur J Neurosci 23: 1956-1960.

KUMAR, K., Toth, C., and Nath, R. (1997) *Deep brain stimulation for intractable pain: a 15-year experience.* Neurosurgery 40, 736-747.

KUNDERMANN, B., Krieg, J.-C., Schreiber, W., and Lautenbacher, S. (2004a) *The effect of sleep deprivation on pain.* Pain Res Manag 9[1], 25-32.

KUNDERMANN, B., Spernal, J., Huber, M. T., Krieg, J. C., and Lautenbacher, S. (2004b) *Sleep deprivation affects thermal pain thresholds but not somatosensory thresholds in healthy volunteers.* Psychosom Med 66[6], 932-937.

LANDIS, C. A., Levine, J.D., Robinson, C. R. (1989) *Decreased Slow-Wave and Paradoxical Sleep in A Rat Chronic Pain Model.* Sleep 12: 167-177.

LANDIS, C. A., Robinson, C. R., Levine, J. D. (1988) *Sleep Fragmentation in the Arthritic Rat.* Pain 34: 93-99.

LAUTENBACHER, S., Kundermann, B., and Krieg, J-C. (2006) *Sleep deprivation and pain perception.* Sleep Medicine 10, 357-369.

LEGATT, A. D., Arezzo, J., Vaughan, H. G. (1980) *Averaged Multiple Unit-Activity As An Estimate of Phasic Changes in Local Neuronal-Activity - Effects of Volume-Conducted Potentials.* J Neurosci Methods 2: 203-217.

LENGYEL, M., Szatmary, Z., and Erdi, P. (2003) *Dynamically detuned oscillations account for the coupled rate and temporal code of place cell firing.* Hippocampus 13[6], 700-714.

LENTZ, M. J., Landis, C. A., Rothermel, J., Shaver, J. L. K. (1999) *Effects of selective slow wave sleep disruption on musculoskeletal pain and fatigue in middle aged women.* Journal of Rheumatology 26: 1586-1592.

LEONE, M. (2006) *Deep brain stimulation in headache.* Lancet Neurol 5, 873-877.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas
As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

- LEONE, M., Franzini, A., Broggi, G., Mea, E., Cecchini, A. P., and Bussone, G. (2006) *Acute hypothalamic stimulation and ongoing cluster headache attacks*. Neurology 67[10], 1844-1845.
- LIN, S.-C., Fervasoni, D., Nicolelis, M. A. (2006) *Fast modulation of prefrontal cortex activity by basal forebrain noncholinergic neuronal ensembles*. J. Neurophysiol. 96(6):3209-3219.
- LIU, X. G., Sandkühler, J. (1995) *Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage*. Neurosci Lett 191[1-2], 43-46.
- LLINÁS, R. R. (1988) *The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function*. Science 242: 1654-1659.
- LLINÁS, R. R., Ribary, U. (1998) *Temporal conjunction in thalamocortical transactions*. Adv. Neurol. 77:95-102, discussion 102-103 Review.
- LOGOTHETIS, N. K. (2002) *The neural basis of the blood-oxygen-level-dependent functional magnetic resonance imaging signal*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 357: 1003-1037.
- LOPES DA SILVA, F. H. (1991) *Neural mechanisms underlying brain waves: from neural membranes to networks*. Electroencephalogram Clinical Neurophysiology 79, 81-93.
- MANDILE, P., Giuditta, A., Romano, F., Piscopo, S., Cotugno, M., and Vescia, S. (2003) *Waking EEG Power spectra in the rat: correlations with training performance*. Cognitive Brain Research 17[1], 94-105.
- MANDILE, P., Vescia, S., Montagnese, P., Piscopo, S., Cotugno, M., and Giuditta, A. (2000) *Post-trial sleep sequences including sleep are involved in avoidance learning of adult rats*. Behav. Brain Res. 112, 23-31.
- MANDILE, P., Vescia, S., Montagnese, P., Romano, F., Giuditta, A. (1996) *Characterization of transition sleep episodes in baseline EEG recording of adult rats*. Physiology & Behavior 60: 1435-1439.
- MARTINDALE, J., Bland-Ward, P. A., Chessell, I. P. (2001) *Inhibition of C-fibre mediated sensory transmission in the rat following intraplantar formalin*. Neurosci Lett 316: 33-36.
- MCCALL, W. D., Tanner, K. D., Levine, J. D. (1996) *Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat*. Neurosci Lett 208: 45-48.
- MCCARLEY, R. W. (2007) *Neurobiology of REM and NREM sleep*. Sleep Medicine 8, 302-330.
- MCCARLEY, R. W., Greene, R. W., Rainnie, D., Portas, C. M. (1995) *Brain-Stem Neuromodulation and REM-Sleep*. Semin Neurosci 7: 341-354.
- MCCARLEY, R. W., Hobson, J. A. (1970) *Cortical unit activity in desynchronized sleep*. Science 167, 901-903.
- MEANS, M. K., Lichstein, K. L., Epperson, M. T., and Johnson, C. T. (2000) *Relaxation therapy for insomnia: nighttime and day time effects*. Behaviour Research and Therapy 38, 665-678.
- MELZACK, R., Casey, K. L. (1968) *Sensory, motivational and central control determinants of pain*. In: *The Skin Senses* (Kenshalo DR, ed), pp 423-443. Springfield: C.C.Thomas.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

- MENDELSON, W. B., Bergmann, B. M., and Tung, A. (2003) *Baseline and post-deprivation recovery sleep in SCN-lesioned rats*. Brain Res 980, 185-190.
- MILLECAMPUS, M., Jourdan, D., Leger, S., Etienne, M., Eschalier, A., and Ardid, D. (2005) *Circadian pattern of spontaneous behavior in monarthritic rats*. Arthritis & Rheumatism 52[11], 3470-3448.
- MOLDOFSKY, H., Scarsbrick, P. (1976) *Induction of Neurasthenic Musculoskeletal Pain Syndrome by Selective Sleep Stage Deprivation*. Psychosomatic Medicine 38: 35-44.
- MONASSI, C. R., Bandler, R., and Keay, K. A. (2003) *A subpopulation of rats show social and sleep-waking changes typical of chronic neuropathic pain following peripheral nerve injury*. Eur.J.Neurosci. 17, 1907-1920.
- MONTEIRO, C., Lima, D., Galhardo, V. (2006) *Switching-on and -off of bistable spontaneous discharges in rat spinal deep dorsal horn neurons*. Neurosci Lett 398: 258-263.
- NGUYEN, J-P., Lefaucheur, J-P., Decq, P., Uchiyama, T., Carpentier, A., Fontaine, D., Brugières, P., Pollin, B., Fève, A., Rostaing, S., Cesaro, P., Keravel, Y. (1999) *Chronic motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. Correlations between clinical, electrophysiological and anatomical data*. Pain 82: 245-251.
- NICOLELIS, M. A. L., Baccala, L. A., Lin, R. C., Chapin, J. K. (1995) *Sensorimotor encoding by synchronous neural ensemble activity at multiple levels of the somatosensory system*. Science 268: 1353-1358.
- NICOLELIS, M. A. L., Fanselow, E. E. (2002a) *Dynamic shifting in thalamocortical processing during different behavioural states*. Phil Trans R Soc Lond B 357: 1753-1758.
- NICOLELIS, M. A. L., Fanselow, E. E. (2002b) *Thalamocortical optimization of tactile processing according to behavioral state*. Nature Neurosci 5: 517-523.
- NICOLELIS, M. A. L., Ghazanfar, A. A., Faggin, B. M., Votaw, S., Oliveira, L. M. O. (1997) *Reconstructing the engram: simultaneous, multisite, many single neuron recordings*. Neuron 18: 529-537.
- O'KEEFE, J., Recce, M. L. (1993) *Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm*. Hippocampus 3, 317-330.
- ONEN, S. H., Alloui, A., Jourdan, D., Eschalier, A., and Dubray, C. (2001) *Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on pain sensitivity in the rat*. Brain Res 900, 261-267.
- PAXINOS, G., Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- PERTOVAARA, A., Almeida, A. (2006) *Descending inhibitory systems*. In: Cervero, F., Jensen, T. S. (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 81. Elsevier, Amsterdam, pp. 179-192.
- PESARAN, B., Pezaris, J. S., Sahani, M., Mitra, P. P., Andersen, R. A. (2002) *Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex*. Nature Neurosci 5: 805-811.

- PEYRON, R., Schneider, F., Faillenot, I., Convers, P., Barral, F. G., Garcia-Larrea, L., and Laurent, B. (2004) *A fMRI study of cortical representation of mechanical allodynia in patients with neuropathic pain*. Neurology 63[10], 1838-1846.
- PINAULT, D. (2003) *Cellular interactions in the rat somatosensory thalamocortical system during normal and epileptic 5-9 Hz oscillations*. Journal of Physiology-London 552: 881-905.
- PISCOPO, S., Mandile, P., Montagnese, P., Cotugno, M., Guiditta, A., Vescia, S. (2001a) *Identification of trains of sleep sequences in adult rats*. Behavioural Brain Res 119: 93-101.
- PISCOPO, S., Mandile, P., Montagnese, P., Cotugno, M., Guiditta, A., and Vescia, S. (2001b) *Trains of sleep sequences are indices of learning capacity in rats*. Behav.Brain Res. 120[1], 13-21.
- POGATZKI, E. M., Gebhart, G. F., and Brennan, T. J. (2002) *Characterization of A Delta- and C-Fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision*. Journal of the Peripheral Nervous System 7[3], 212.
- PORRECA, F., Ossipov, M. H., Gebhart, G. F. (2002) *Chronic pain and medullary descending facilitation*. Trends in Neurosciences 25: 319-325.
- PORRO, C. A., Cavazzuti, M., Galetti, A., Sassatelli, L. (1991) *Functional-Activity Mapping of the Rat Brain-Stem During Formalin-Induced Noxious-Stimulation*. Neuroscience 41: 667-680.
- PORRO, C. A., Cavazzuti, M., Lui, F., Giuliani, D., Pellegrini, M., Baraldi, P. (2003) *Independent time courses of supraspinal nociceptive activity and spinally mediated behavior during tonic pain*. Pain 104: 291-301.
- PUIG, S., Sorkin, L. S. (1996) *Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity*. Pain 64: 345-355.
- RAUSCHECKER, J. P. (1998) *Cortical control of the thalamus: top-down processing and plasticity*. Nature Neurosci 1: 179-180.
- ROMAN, C., Nebieridze, N., Sastre, A., Reilly, S. (2006) *Effects of lesions of the bed nucleus of the stria terminalis, lateral hypothalamus, or insular cortex on conditioned taste aversion and conditioned odor aversion*. Behav Neurosci. 120(6):1257-1267
- SCHÜTZ, T. C. B., Tufik, S. (2003) *Sleep alterations in an experimental orofacial pain model in rats*. Brain Research 993[164], 171.
- SEAGER, M. A., Johnson, L. D., Chabot, E. S., Asaka, Y., Berry, S. D. (2002) *Oscillatory brain states and learning: Impact of hippocampal theta-contingent training*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 1616-1620.
- SELTZER, Z., Cohn, S., Ginzburg, R., Beilin, B. (1991) *Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge*. Pain 45: 69-75.
- SELTZER, Z., Dubner, R., Shir, Y. (1990) *A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury*. Pain 43: 205-218.
- SEWARDS, T. V., Seward, M. A. (2002) *The medial pain system: Neural representations of the motivational aspect of pain*. Brain Res. Bulletin 59(3):163-180.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

- SHAPIRO, C., Girdwood, P. (1981) *Protein-Synthesis in Rat-Brain During Sleep*. Neuropharmacol 20: 457-460.
- SIMPSON, B. A. (1999) *Spinal cord and brain stimulation*. In: Textbook of Pain (Wall PD, Melzack R, eds), pp 1353-1381. New York: Churchill and Livingstone.
- SIMPSON, K. H., Ward, J. (2004) *A randomized, double-blind, crossover study of the use of transcutaneous spinal electroanalgesia in patients with pain from chronic critical limb ischemia*. Journal of Pain and Symptom Management 28[5], 511-516.
- SKAGGS, W. E. (1996) *Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences*. Hippocampus 6, 149-172.
- SOIKKELI, R., Partanen, J., Soininen, H., Paakkonen, A., Riekkinen, P. (1991) *Slowing of EEG in Parkinsons-Disease*. Electroencephalography and Clinical Neurophysiology 79: 159-165.
- STERIADE, M. (1999) *Coherent oscillations and short-term plasticity in corticothalamic networks*. Trends in Neurosciences 22: 337-345.
- STERIADE, M. (2001) *Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems*. J. Neurophysiol. 86(1):1-39.
- STERIADE, M., Contreras, D., Dossi, R. C., Nuñez, A. (1993) *The slow (<1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: Scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks*. Journal of Neuroscience 13: 3284-3299.
- SUGA, N., Gao, E. Q., Zhang, Y. F., Ma, X. F., Olsen, J. F. (2000) *The corticofugal system for hearing: Recent progress*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 11807-11814.
- TAI, S. K., Huang, F-D., Moochhla, S., and Khanna, S. (2006) *Hippocampal theta state in relation to formalin nociception*. Pain 121, 29-42.
- TJØLSEN A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. (1992) *The formalin test: an evaluation of the method*. Pain. 51(1):5-17.
- TREEDE, R. D., Campbell, J. N., Meyer, R. A. (1998) *Myelinated mechanically-intensitive afferents from monkey hairy skin: heat response properties*. J Neurophysiol 11:1082-1093.
- TREEDE, R. D., Magerl, W. (1992) *Modern concepts of pain and hyperalgesia: beyond the polymodal C-nociceptor*. News Physiol Sci. 38:397-421.
- TSUBOKAWA, T., Katayama, Y., Yamamoto, T., Hirayama, T., and Koyama, S. (1991) *Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain*. Acta Neurochir Suppl (Wien) 52, 137-139.
- UKPONMWAN, O. E., Dzoljic, M. R. (1984) *Enkephalinase Inhibition Antagonizes the Increased Susceptibility to Seizure Induced by Rem-Sleep Deprivation*. Psychopharmacology 83: 229-232.
- UKPONMWAN, O. E., Rupreht, J., Dzoljic, M. R. (1984) *REM-Sleep Deprivation Decreases the Antinociceptive Property of Enkephalinase-Inhibition, Morphine and Cold-Water-Swim*. Gen Pharmac 15: 255-258.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas
As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

- VACCARINO, A. L., Melzack, R. (1992) *Temporal processes of formalin pain: differential role of the cingulum bundle, fornix pathway and medial bulboreticular formation.* Pain 44, 257-271.
- VANDERWOLF, C. H. (1969) *Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat.* Electroencephalogram Clinical Neurophysiology 26: 407-418.
- VESCIA, S., Mandile, P., Montagnese, P., Romano, F., Cataldo, G., Cotugno, M., and Giuditta, A. (1996) *Baseline transition sleep and associated sleep episodes related to the learning ability of rats.* Physiol Behav 60, 1513-1525.
- WALL, P. D., Devor, M., Scadding, J. W., Schonfeld, D., Seltzer, Z., Tomkiewicz, M. M. (1979) *Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa.* Pain 7: 103-111.
- WALL, P. D., Gutnick, M. J. (1974) *Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma.* Nature 248: 740-743.
- WEI, H., Zhao, W., Wang, Y-X., and Pertovaara, A. (2007) *Pain-related behavior following REM sleep deprivation in the rat: Influence of peripheral nerve injury, spinal glutamatergic receptors and nitric oxide.* Brain Res 1148, 105-112.
- WEINBERGER, M., Mahant, N., Hutchison, W. D., Lozano, A. M., Moro, E., Hodaie, M., Lang, A. E., Dostrovsky, J. O. (2006) *Beta oscillatory activity in the subthalamic nucleus and its relation to dopaminergic response in Parkinson's disease.* J Neurophysiol 96: 3248-3256.
- WEYAND, T. G., Boudreaux, M., Guido, W. (2001) *Burst and tonic response modes in thalamic neurons during sleep and wakefulness.* J Neurophysiol 85: 1107-1118.
- WIEST, M. C., Nicolelis, M. A. L. (2003) *Behavioral detection of tactile stimuli during 7-12 Hz cortical oscillations in awake rats.* Nature Neurosci 6: 913-914.
- WILKINSON, H. A., Davidson, K. M., and Davidson, R. I. (2000) *Bilateral anterior cingulotomy for chronic noncancer pain.* Neurosurgery 46[6], 1535-1536.
- WILLIS, W. D., Coggeshall, R. E. (2001) *Sensory mechanisms of the spinal cord.* 2nd Ed. Plenum Press.
- WINSON, J. (1974) *Patterns of hippocampal theta rhythm in the freely moving rat.* Electroencephalogram Clinical Neurophysiology 36: 291-301.
- YAMAMOTO, T., Katayama, Y., Obuchi, T., Kano, T., Kobayashi, K., Oshima, H., and Fukaya, C. (2006) *Thalamic sensory relay nucleus stimulation for the treatment of peripheral deafferentation pain.* Stereotact Funct Neurosurg 84[4], 180-183.
- ZIMMERMANN, M. (1983) *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.* Pain 16: 109-110.

Capítulo VI – Referências Bibliográficas

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neurais

VII – ANEXOS

A.1. GUISpecgram

```
% GUISpecgram.m

% Main function
%
% Análise de sinal de LFPs
% Funções: - plot raw data;
%           - plot Power Spectra Density Histogram pelo Algoritmo P. Welch de sinai;
%           - plot spectrogram de sinais de LFPs.
%           - exportação de resultados em TIF/JPEG (600 dpi)

function GUISpecgram(action)

    global sinal
    global nooverlap
    global window
    global nfft
    global fs

    if nargin<1
        action='create';
        disp('Criação da interface GUI');
        %return
    end

    switch action
        case 'create'
            CreateGUI;
        case 'loadfile'
            Loadfile;
        case 'parafft'
            disp('Parametros do Espectrograma de LFPs');
            paraFFT;
        case 'dofft'
            disp('doFFT');
            doFFT;
        case 'dopsd'
            disp('doPSD');
            doPSD;
        case 'docshelp'
            disp('docsHelp');
            docsHelp;
        case 'threshold'
            Threshold;
    end

function CreateGUI

    hfig=figure(...%
        'units','pixels','position',[200 50 500 350],...%
        'tag','GUISpecgram', 'name','GUISpecgram',...%
        'menubar','none','numbertitle','off');

    % Criação do Bar-file menu
    hmenu=uimenu('label','Ficheiro');
    uimenu(hmenu,'label','Abrir ...','callback','GUISpecgram loadfile')
    uimenu(hmenu,'label','Exportar Gráfico','callback','expGraf rowSinal')
    uimenu(hmenu,'label','Exit','callback','closereq','separator','on');

    % Criação do Bar-help menu
    hmenu2=uimenu('label','Ajuda');
    uimenu(hmenu2,'label','Ajuda por Tópicos','callback','docsHelp');

    % Criação dos eixos para o gráfico
    haxis=axes('units','pixels','position',[65 130 390 180],...
        'nextplot','replacechildren',...
        'ButtonDownFcn','GUISpecgram threshold');
    title('Sinal: vazio','fontweight','bold')
    axis('xy');
    xlabel('Tempo (s)');
    ylabel('mVolts');

    % Criação de um botão para iniciar introdução de parametros / PSD análise
    %(Click calls back to GUISpecgram, arg="parametros")
    hbutton=uicontrol('style','pushbutton',...
        'units','pixels','pos',[170 40 170 30],...
        'string','Parametros - Espectrograma LFP',...
        'callback','GUISpecgram parafft');
    set(hbutton,'userdata',haxis)
```

```

% Selecção do ficheiro de sinal para análise

function LoadFile

    global sinal

    % Sinal Nome em titulo gráfico
    haxis=get(gcf,'userdata');
    [filename,pathname]=uigetfile('.txt','Selecionar ficheiro de signal');
    if ~ischar(filename),return,end

    longfilename=strcat(pathname,filename);
    sinal=load(longfilename);
    if size(sinal,2)>1
        sinal=sinal(:,end);
    end

    cla
    plot(sinal,'b','tag','sinal')
    title(['Sinal: ', filename], 'fontweight', 'bold')

function Threshold

    haxis=get(gcf,'userdata');

    hthresh=findobj(haxis,'tag','threshold');
    delete(hthresh)
    pt=get(gca,'currentpoint');
    ypos=pt(1,2);

    ydata=[ypos ypos];
    xdata=get(gca,'xlim');
    hthresh=line(xdata,ydata, ...
        'color','r','linewidth', 1.5, ...
        'erasemode','xor','tag','threshold');
    drawnow

% Definição dos parâmetros da a FFT

function paraFFT(sinal,nfft,fs,window,nooverlap)

    global sinal

    figure...
        'units','pixels','position',[200 50 400 300],...
        'tag','doSpecgram', 'name','Parâmetros do Espectrograma',...
        'menubar','none','numbertitle','off');
    hmenu=uimenu('label','Ficheiro');
    uimenu(hmenu,'label','Exit','callback','closereq','separator','on');

    hmenu=uimenu('label','Ajuda');
    uimenu(hmenu,'label','Ajuda por Tópicos','callback','docsHelp');

    % FS - Frequencia de amostragem
    fs_text=uicontrol('style','text',...
        'units','pixels','pos',[30 200 100 50],...
        'FontWeight','bold',...
        'BackgroundColor','blue',...
        'string','Frequencia de Sampling');
    global fs_box
    fs_box=uicontrol('style','popup',...
        'String','500|1000',...
        'BackgroundColor','white',...
        'Position',[30 170 100 50],'callback','paraset_fs');
    uicontrol(fs_box); % dar destaque a este botão

    % NFFT - Coeficiente da FFT
    nfft_text=uicontrol('style','text',...
        'units','pixels','pos',[150 200 100 50],...
        'FontWeight','bold',...
        'BackgroundColor','blue',...
        'string','nFFT');
    global nfft_box
    nfft_box=uicontrol('style','popup',...
        'String', '256|512|1024|2048',...
        'BackgroundColor','white',...
        'Position', [150 170 100 50],'callback','paraset_nfft');

    % WINDOWS - Janela de Hanning
    window_text=uicontrol('style','text',...
        'units','pixels','pos',[270 200 100 50],...
        'FontWeight','bold',...
        'BackgroundColor','blue',...

```

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

```

'string','Janela de Hanning');
global windows_box
window_box=uicontrol('style','popup',...
    'String','128|256|512',...
    'BackgroundColor','white',...
    'Position',[270 170 100 50],...
    'callback','paraset_window');

% // botão para proceder Espectrograma

hbutton2=uicontrol('style','pushbutton',...
    'units','pixels','pos',[30 140 165 50],...
    'FontWeight','bold',...
    'BackgroundColor','black',...
    'ForegroundColor','red',...
    'string','LFP - Espectrograma',...
    'callback','doFFT');

% // botão para proceder ao Power Spectra Density

hbutton3=uicontrol('style','pushbutton',...
    'units','pixels','pos',[205 140 165 50],...
    'FontWeight','bold',...
    'BackgroundColor','black',...
    'ForegroundColor','red',...
    'string','LFP - Power Spectra Density',...
    'callback','doPSD');

% barra info do help

help_text=uicontrol('style','text',...
    'units','pixels','pos',[30 75 340 28],...
    'BackgroundColor','red',...
    'FontWeight','bold',...
    'string','(*) Consultar ajuda para configuração dos parametros de análise do Espectrograma');

title_text=uicontrol('style','text',...
    'units','pixels','pos',[30 255 340 15],...
    'BackgroundColor','blue',...
    'foregroundColor','white',...
    'fontWeight','bold',...
    'string','PARAMETROS LFP - ESPECTROGRAMA');

% barra info do parametros default

help_text_defaul=uicontrol('style','text',...
    'units','pixels','pos',[30 112 340 14],...
    'BackgroundColor','yellow',...
    'string','(DEFAULT) FS=1000 Hz, nFFT=512, Hanning Window=256.');

% barra info dos parametros do espectrograma
% barra info do parametros default

helpdesk_text_defaul=uicontrol('style','text',...
    'units','pixels','pos',[30 38 340 28],...
    'BackgroundColor','white',...
    'string','NOTA: O comprimento da janela de Hanning não pode superar o comprimento aplicado na FFT');

% doFFT.m

function X=doFFT(x,nfft,fs,window);
global sinal

global window
global fs
global nfft

if nargin<4, window=load('param\para_window.txt'); end
if nargin<3, fs=load('param\para_fs.txt'); end
if nargin<2, nfft=load('param\para_nfft.txt'); end

global window

x = sinal;
x = x(:); % assegurar que é uma coluna

figure...
    'units','pixels','position',[200 50 900 400],...
    'tag','doFFT', 'name','Espectrograma de Local Field Potential Data',...
    'menubar','none','numbertitle','off');
hmenu=uimenu('label','Ficheiro');
uimenu(hmenu,'label','Exportar Gráfico - Em TIF','callback','expGraf tiff');
uimenu(hmenu,'label','Exportar Gráfico - Em Jpeg','callback','expGraf jpeg')
uimenu(hmenu,'label','Exit','callback','closereq','separator','on');

hmenu=uimenu('label','Ajuda');
uimenu(hmenu,'label','Ajuda por Tópicos','callback','docsHelp');

```

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais

```
[b,t,f]=specgram(x,nfft,fs,hann(window));
imagesc(t,f,20*log10(abs(b)));

axis xy
colormap(jet)
xmin=0;
xmax=(length(sinal)/fs);
ymax=30;

xlim([xmin xmax]);
ylim([xmin ymax]);
xlabel('Tempo(s)');
ylabel('Frequencia(Hz)');
title('LFP - Espectrograma','fontweight','bold')
colorbar;
zoom xmax;

colormap_set=uicontrol('style','text',...
    'units','pixels','pos',[5 35 100 50],...
    'FontWeight','bold',...
    'BackgroundColor','blue',...
    'foregroundcolor','white',...
    'string','Tipo de Colormap');
global colormap_set_param
colormap_set_param=uicontrol('style','popup',...
    'String','jet|bone|copper|hot|gray',...
    'BackgroundColor','white',...
    'foregroundcolor','black',...
    'Position',[5 5 100 50],'callback','paraset_colormap');

% doPSD.m

% Power Spectra density - LFP
% Pelo algoritmo de Welch

function doPSD

    global sinal
    global fs

    figure...
        'units','pixels','position',[200 50 400 350],...
        'tag','doFFT', 'name','LFP - Power Spectra Density',...
        'menubar','none','numbertitle','off');

    Hs=spectrum.welch;
    psd(Hs,sinal,'fs',fs);
    title('LFP - Power Spectra Density','fontweight','bold');
    axis xy
    xlabel('Frequencia (kHz)');
    ylabel('Power/Frequencia(dB/Hz)');

% expGraf.m

% Exportação do sinal de LFPs naïve.
% Exportação do espetrograma em formato imagem TIF ou JPEG.

function expGraf(action)

    switch action
        case 'tiff' % Sub-function Imagem em TIF
            tiff;
        case 'jpeg' % Sub-function Imagem em JPEG
            jpeg;
        case 'rowSinal'
            rowSinal;
    end

    function tiff % tela espetrograma
        disp('exportar gráfico - tiff');
        set(gcf, 'PaperPositionMode', 'auto') % screen size
        print -dtiff lfp-espectrograma

    function jpeg % tela espetrograma
        disp('exportar gráfico - jpeg');
        set(gcf, 'PaperPositionMode', 'auto') % screen size
        print -djpeg lfp-espectrograma

    function rowSinal % tela n1
```

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

```
disp('exportar gráfico - row');
set(gcf, 'PaperPositionMode', 'auto')    % screen size
print -djpeg lfp-row-plot
```

```
% filter.m
function Hd = filter
% FILTER Returns a discrete-time filter object
```

```
fs = 1000
Fpass = 49;          % Passband Frequency
Fstop = 51;          % Stopband Frequency
Apass = 1;           % Passband Ripple (dB)
Astop = 80;          % Stopband Attenuation (dB)
match = 'stopband'; % Band to match exactly

% Construct an FDESIGN object and call its BUTTER method.
h = fdesign.lowpass(Fpass, Fstop, Apass, Astop, fs);
Hd = butter(h, 'MatchExactly', match);
```

```
% paraset_colormap.m
```

```
% Alterar o colormap após aplicação do espectrograma ao sinal.
% Por "default" é gerado com colormap="jet".
```

```
function paraset_colormap
```

```
global colormap_set_param
global fs
global sinal

val=get(colormap_set_param,'Value');
if val == 1
    colormap(jet);
elseif val == 2
    colormap(bone);
elseif val == 3
    colormap(copper);
elseif val == 4
    colormap(hot);
elseif val == 5
    colormap(gray);
end
```

```
% paraset_fs.m
```

```
% Definição da frequência de amostragem do sinal
```

```
function paraset_fs
```

```
global fs_box
val=get(fs_box,'Value');
if val == 1
    global fs
    fs = 500;
    save('param\para_fs.txt','fs','-ascii');
elseif val == 2
    global fs
    fs = 1000;
    save('param\para_fs.txt','fs','-ascii')
end
```

```
% paraset_nfft.m
```

```
% Definição do comprimento da FFT
```

```
function paraset_nfft
```

```
global nfft_box
val=get(nfft_box,'Value')

if val==1
    global nfft
    nfft=256;
    save('param\para_nfft.txt','nfft','-ascii');
elseif val==2
    global nfft
    nfft=512;
    save('param\para_nfft.txt','nfft','-ascii');
elseif val==3
    global nfft
```

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais

```
nfft=1024;
save('param\para_nfft.txt','nfft','-ascii');
elseif val==4
    global nfft
    nfft=2048;
    save('param\para_nfft.txt','nfft','-ascii');
end

* paraset_window.m
# Definição do comprimento da janela de Hanning

function paraset_window

    global window_box
    val = get(window_box,'Value');

        if val==1
            global window
            window=128;
            save('param\para_window.txt','window','-ascii');
        elseif val==2
            global window
            window=256;
            save('param\para_window.txt','window','-ascii');
        elseif val==3
            global window
            window=512;
            save('param\para_window.txt','window','-ascii');
        end
```

A.2. Função FindContra

```
% FindContra.m

% Algoritmo procura das oscilações na banda theta (4-9 Hz) nos canais de LFPs e comparação com os
% tempos iniciais de cada contracção muscular da pata do rato injectada com formol (janela -250 a 0
% msec).
%
% Execução do algoritmo para uma janela de tempo de 3600 seg.
%
% Canais de LFPs:
%     SI, córtex somato-sensitivo primário;
%     VPL, núcleo talâmico ventro-posterior-lateral.
%
% Helder Cruz 2006/07

function FindContra

SI=load(SI_dataset.txt','-ascii');
VPL=load('VPL_dataset.txt','-ascii');
Jerks=load('Jerks.txt','-ascii');      % ficheiro com todos os tempos iniciais das contracções
                                         % musculares observadas em vídeo (evento = OE).
                                         % A definição do tipo de eventos considerados encontra-se
                                         % no Capítulo II.

numberRealJerks=size(Jerks);
save('numberRealJerks.txt','numberRealJerks','-ascii');

BIN=0.05;
timex=[0:0.05:3599.95];
tempo=[0:0.5:3599.5];

% Definição do número de pontos

Points=input('Select number of points per interval [1 or 3 (default=1)] :','s')
if isempty(Points)
    Points=1;
end
if Points==3
    disp('Select per MAX/int or Mean/int?')
end
method=input('(Default = Mean/int), Type 1 for Mean/int, Type 2 for Max/int -->','s')
if isempty(method)
    method=1;
end

if method==1
    SI=mean(SI(1:3,:));
    VPL=mean(VPL(1:3,:));
elseif method==3
    SI=max(SI(1:3,:));
    VPL=max(VPL(1:3,:));
End

%
% Calculo dos parametros dos sinais de LFPs

meanSI=mean(abs(SI));
meanVPL=mean(abs(VPL));

% -----
% Rotina para o canal do sinal de LFPs de SI
% -----

absSI=abs(SI);
int8(absSI);
comprimentoSI=length(absSI);
matrixIntervalsSI=0:10:comprimentoSI;
SI_10=length(matrixIntervalsSI);

maxSI_List=zeros(1,SI_10);

for nSI=1:(SI_10-10)          % Efectuar um desfazamento de 1 bin (50 msec)

    while SI_10>=1
        indexSI=matrixIntervalsSI(1,nSI);
        indexSIStrt=indexSI+1;
        indexSIEnd=indexSI+10;
        disp(indexSIStrt)
        disp(indexSIEnd)

        SIInt=absSI(1,indexSIStrt+1:indexSIEnd);
        disp(SIInt)
```

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais

```

        maxIntSI=max(SIInt);
        disp(maxIntSI)
        maxIntSI=max(xSITrans);
        maxSI_List(1,nSI)=maxIntSI;
    break
end
tempSI=zeros(1,7200)
tempSI=maxSI_List(1,2:7201);
maxSI_List=tempSI;

save('maxSI_List_results.txt','maxSI_List','-ascii'); % matriz de 1x7200
maxSI=load('maxSI_List_results.txt','-ascii');

Result_Final_SI=zeros(1,7200);

% Definição dos limites de oscilação do sinal para a seleção de eventos.

for j=1:7200

    rSI1=abs((maxSI(1,j)));
    disp(rSI1)
    rSI2=abs((meanSI(1,1)));
    disp(rSI2)

    if log2(rSI1)>=log2((2.5*rSI2));
        Result_Final_SI(1,j)=1;
    elseif log2(rSI1)<log2((2.5*rSI2));
        Result_Final_SI(1,j)=0;
    end
end

sumSI=sum(Result_Final_SI);
disp(sumSI)
save('Result_Final_SI.txt','Result_Final_SI','-ascii');

%%-----
%% Seleção da Percentagem de acerto para SI
%% tempo de Saída +/- 250 ms Sinal com BIN=500 msec
%%-----

TranfResult_Final_SI=load('Result_Final_SI.txt','-ascii');% 0 e 1(yes)

TimePrevSI=zeros(2,7200);

TimePrevSI(1,:)=TranfResult_Final_SI
TimePrevSI(2,:)=tempo
save('TimePrevSI.txt','TimePrevSI','-ascii');

SISI=length(TimePrevSI);
sumTimePrevSI=sum(TimePrevSI(1,:));
save('sumTimePrevSI.txt','sumTimePrevSI','-ascii');
TimePrevSI_100zeros=TimePrevSI;

for a=1:length(TimePrevSI_100zeros(1,:))
    if TimePrevSI_100zeros(1,a)==0
        TimePrevSI_100zeros(2,a)=0;
    elseif TimePrevSI_100zeros(1,a)==1
        TimePrevSI_100zeros(2,a)=TimePrevSI_100zeros(1,a);
    end
end

FinalPrevTimesSI=zeros(1,sumTimePrevSI);

indices=find(TimePrevSI_100zeros(2,:));
indices_length=length(indices);

FinalPrevTimesSI=indices;
X1=nonzeros(TimePrevSI);
disp(X1)
FinalPrevTimesSI=X1;

save('FinalPrevTimesSI.txt','FinalPrevTimesSI','-ascii');
load('FinalPrevTimesSI.txt','-ascii');
pause

%%-----
%% Encontrar quantos dos Jerks Previstos se encontram
%% nos intervalos reais (OE)
%%-----

previstosSI=FinalPrevTimesSI;
prevSILength=length(previstosSI);
realSI=Jerks;
realSI=realSI';
previstosSI=previstosSI;

```

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

```

limSI=length(realSI);
limSI=limSI';

respostaSI=zeros(1,length(previstosSI));
%respostaSI=zeros(1,1028);

%Tabela para os Previstos %
previstosSJerk5=zeros(3,length(previstosSI));
previstosSJerk5(2,:)=previstosSI(1,:)-0.05;
previstosSJerk5(3,:)=previstosSI(1,:)+0.05;

for t=1:length(previstosSI)

    tMin=previstosSI(1,t);
    tMin=tMin-0.25;

    tMax=previstosSI(1,t);
    tMax=tMax+0.25;

    tTemp=(tMin+tMax)/2;

    for tt=1:limSI
        if ((realSI(1,tt)-tTemp(:)<=0.25)&(tTemp(:)-realSI(1,tt)>=-0.25));
            respostaSI(1,t)=1; %break
        else
            respostaSI(1,t)=0;
            break;
        end
    end
end

save('respostaSI.txt','respostaSI','-ascii');

----- Percentagem de Acertos -----
disp('Percentagem de Acertos para SI')

numberSI=sum(respostaSI);
    disp('Número de SI - Previsto Acertado = ')
    disp(numberSI)
numberReais=limSI;
    disp('Número de SI - Reais Video = ')
    disp(numberReais)
PercentagemSI=(numberSI/limSI)*100;
    save('PercentagemSI.txt','PercentagemSI','-ascii');
    disp('Percentagem de Acerto')
    disp(PercentagemSI)
    pause

----- Rotina para o canal do sinal de LFPs de VPL -----
absVPL=abs(VPL);
int8(absVPL);
comprimentoVPL=length(absVPL);
matrixIntervalsVPL=0:10:comprimentoVPL;

VPL_10=length(matrixIntervalsVPL);

maxVPL_List=zeros(1,VPL_10);

for nVPL=1:(VPL_10-10)

    while VPL_10>=1
        indexVPL=matrixIntervalsVPL(1,nVPL);
        indexVPLstart=indexVPL+1;
        indexVPLEnd=indexVPL+10;
        disp(indexVPLstart)
        disp(indexVPLEnd)

        VPLInt=absVPL(1,indexVPLstart+1:indexVPLEnd);
        disp(VPLInt)

        maxIntVPL=max(VPLInt);
        disp(maxIntVPL)
        maxVPL_List(1,nVPL)=maxIntVPL;

        break
    end
end
tempVPL=zeros(1,7200)
tempVPL=maxVPL_List(1,2:7201);

```

```

maxVPL_List=tempVPL;
save('maxVPL_List_results.txt','maxVPL_List','-ascii');
maxVPL=load('maxVPL_List_results.txt','-ascii');

Result_Final_VPL=zeros(1,7200);

% Definição dos limites de oscilação do sinal para a seleção de eventos.

for j=1:7200
    rVPL1=abs((maxVPL(1,j)));
    disp(rVPL1)
    rVPL2=abs((meanVPL(1,1)));
    disp(rVPL2)
    if log2(rVPL1)>=log2((2.5*rVPL2))
        Result_Final_VPL(1,j)=1;
    elseif log2(rVPL1)<log2((2.5*rVPL2));
        Result_Final_VPL(1,j)=0;
    end
end
sumVPL=sum(Result_Final_VPL);
disp(sumVPL)
save('Result_Final_VPL.txt','Result_Final_VPL','-ascii');

%-----
% Selecção da Percentagem de acerto para VPL
% tempo de Saída +/- 250 ms Sinal com BIN=500 msec
%-----

TranfResult_Final_VPL=load('Result_Final_VPL.txt','-ascii');% 0 e 1(yes)

TimePrevVPL=zeros(2,7200); % matriz dupla para indexar o tempo

TimePrevVPL(1,:)=TranfResult_Final_VPL
TimePrevVPL(2,:)=tempo
save('TimePrevVPL.txt','TimePrevVPL','-ascii');

VPLVPL=length(TimePrevVPL);
sumTimePrevVPL=sum(TimePrevVPL(1,:));
save('sumTimePrevVPL.txt','sumTimePrevVPL','-ascii');
TimePrevVPL_100zeros=TimePrevVPL;

for a=1:length(TimePrevVPL_100zeros(1,:))
    if TimePrevVPL_100zeros(1,a)==0
        TimePrevVPL_100zeros(2,a)=0;
    elseif TimePrevVPL_100zeros(1,a)==1
        TimePrevVPL_100zeros(2,a)=TimePrevVPL_100zeros(2,a);
    end
end
FinalPrevTimesVPL=zeros(1,sumTimePrevVPL);
indices=find(TimePrevVPL_100zeros(2,:));
indices_length=length(indices);

FinalPrevTimesVPL=indices;
X2=nonzeros(TimePrevVPL);
disp(X2)
FinalPrevTimesVPL=X2;

save('FinalPrevTimesVPL.txt','FinalPrevTimesVPL','-ascii');
load('FinalPrevTimesVPL.txt','-ascii');

pause

%-----
% Encontrar quantas contracções previstas se encontram
% nos intervalos reais em vídeo
%-----

previstosVPL=FinalPrevTimesVPL;
prevVPLlength=length(previstosVPL);
realVPL=Jerks;
realVPL=realVPL';
previstosVPL=previstosVPL;

limVPL=length(realVPL);
limVPL=limVPL';

respostaVPL=zeros(1,length(previstosVPL));
previstosVPLJerks=zeros(3,length(previstosVPL));
previstosVPLJerks(2,:)=previstosVPL(1,:)-0.05;
previstosVPLJerks(3,:)=previstosVPL(1,:)+0.05;

for t=1:length(previstosVPL)
    tMin=previstosVPL(1,t);

```

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

```

tMin=tMin-0.25;
tMax=previstosVPL(1,t);
tMax=tMax+0.25;

tTemp=(tMin+tMax)/2;

for tt=1:limVPL
    if ((realVPL(1,tt)-tTemp(:))<=+0.25) | (tTemp(:)-realVPL(1,tt)>=-0.25));
        respostaVPL(1,t)=1; %break
    else
        respostaVPL(1,t)=0;
    end
end

save('respostaVPL.txt','respostaVPL','-ascii');

%----- Percentagem de Acertos -----
disp('Percentagem de Acertos para VPL')

numberVPL=sum(respostaSI);
disp('Número de VPL - Previsto Acertado = ')
disp(numberVPL)
numberReais=limVPL;
disp('Número de VPL - Reais Video = ')
disp(numberReais)
PercentagemVPL=(numberVPL/limVPL)*100;
save('PercentagemVPL.txt','PercentagemVPL','-ascii');
disp('Percentagem de Acerto')
disp(PercentagemVPL)
pause

%----- Plots
%-----

FinalSI=FinalPrevTimesSI/2;
FinalVPL=FinalPrevTimesVPL/2;

disp('Proceder à representação gráfica? [1 to Sim/ 2 to Não]')
makePlots=input('(default=1)', 's')
if isempty(makePlots)
    makePlots=1;
end
if makePlots==1
    hold on
    plot(Jerks,0.1,'--rs','LineWidth',2,...
        'MarkerEdgeColor','k',...
        'MarkerFaceColor','g',...
        'MarkerSize',10);
    disp('Preview - SI (Blue)')
    pause
    plot(FinalSI,0.2,'--*','LineWidth',2,...
        'MarkerEdgeColor','k',...
        'MarkerFaceColor','b',...
        'MarkerSize',10);
    disp('Preview - VPL (Red)')
    pause
    plot(FinalVPL,0.3,'-+','LineWidth',2,...
        'MarkerEdgeColor','k',...
        'MarkerFaceColor','r',...
        'MarkerSize',10);
    hold off
elseif makePlots==2
    disp('No')
end

%----- Plots - por intervalos de tempo
%-----

reply=input('Representação gráfica por intervalos de tempo? S/N [S]: ','s');

if isempty(reply)
    reply = 'S';
else
    reply = 's';
end

if reply=='S'|reply=='s'

    FinalSI=FinalPrevTimesSI/2;
    FinalVPL=FinalPrevTimesVPL/2;

```

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

```
hold on

Min=input('Seleccionar o intervalo - Min (segundos) --> [0] :','s')
if isempty(Min)
    Min=0;
end

Max=input('Seleccionar o intervalo - Max (segundos) --> [3600] :','s')
if isempty(Max)
    Max=3600;
end
MinMaxJerks=Jerks(1,Min:Max);
Jerks_=Jerks(1,MinMaxJerks);
plot(Jerks_,0.1,'-xg');
disp('Previstos - SI (*)')
pause

MinMaxSI=FinalSI(1,Min:Max);
FinalSI_=FinalSI(1,MinMaxSI);
plot(FinalSI_,0.2,'-*b');

disp('Previstos - VPL (+)')
pause

MinMaxVPL=FinalSI(1,Min:Max);
FinalVPL_=FinalVPL(1,MinMaxVPL);
plot(FinalVPL_,0.3,'-+r');

hold off
elseif reply=='N'|reply=='n'
    disp('No');
end
```

A.3. Função StatHypnoALL

```
% StatHypnoALL.m
%
% HYPNO Statistics
%
% Determinação do tempo total dispensado em cada estado de comportamento neuronal por sessão de
% registo (12 hr. período diurno, 12 hr. período nocturno).
%
% Mapas de estados
% ASCII to DEC
%
% N, artefacto (amarelo) 78
% U, indefinido/transição (branco) 85
% 2, WK (Walking states) = QW+AE (azul escuro) 50
% 3, SWS (slow-wave-sleep) (vermelho) 51
% 4, REM (rapid eye movement) (verde) 52
% 5/M, (WT/Movimento indefinido) (azul claro) 53/77
%
% HYPNO data file: em "string" convertida para ASCII após abertura
%
% Open data file
% [filename,pathname]=uigetfile('.txt','Select HYPNO file data');
% if ~ischar(filename),return,end
%
longfilename=strcat(pathname,filename);
ssHYPNO=load(longfilename); %& DATA in decimal
lengthHYPNO=length(ssHYPNO)
%
OutputMatrix=zeros(7,1); % number of states/transitions
%
% Contagem total do número de tempo em cada estado
disp('Time in each behavior state per recording.')
tc_N=0;
tc_2=0;
tc_3=0;
tc_4=0;
tc_5=0;
tc_M=0;
tc_U=0;
%
for i=1:lengthHYPNO
    if ssHYPNO(1,i)==78;
        tc_N=tc_N+1;
    elseif ssHYPNO(1,i)==50;
        tc_2=tc_2+1;
    elseif ssHYPNO(1,i)==51;
        tc_3=tc_3+1;
    elseif ssHYPNO(1,i)==52;
        tc_4=tc_4+1;
    elseif ssHYPNO(1,i)==53;
        tc_5=tc_5+1;
    elseif ssHYPNO(1,i)==77;
        tc_M=tc_M+1;
    elseif ssHYPNO(1,i)==85;
        tc_U=tc_U+1;
    end
end
%
OutputMatrix (1,1)= ((tc_2*100)/lengthHYPNO);
OutputMatrix (2,1)= ((tc_3*100)/lengthHYPNO);
OutputMatrix (3,1)= ((tc_4*100)/lengthHYPNO);
OutputMatrix (4,1)= ((tc_5*100)/lengthHYPNO);
OutputMatrix (5,1)= ((tc_M*100)/lengthHYPNO);
OutputMatrix (6,1)= ((tc_U*100)/lengthHYPNO);
OutputMatrix (7,1)= ((tc_N*100)/lengthHYPNO);
OutputMatrix = OutputMatrix';
%
disp('Print screen OutputMatrix')
%
disp('WK SWS REM WT M U N')
disp(OutputMatrix)
%
% Ficheiro de saída em matriz
% [filename, pathname] = uiputfile( ...
% {'*.txt'}, ...
% 'Save as'); save(filename,'OutputMatrix','-ascii');
%
% Raster da matrix de saída
% imagesc(OutputMatrix)
% colorbar;
```

A.4. Função States

```
% States.m

% Função: Contabilização do número de transições entre estados de
% comportamento através da string do hipnograma, duas opções.
%
% Opção 1: wildcard_state=7; para transições do tipo U->x e x->U
% Opção 2: wildcard_state=6; só para transições entre estados, sem
% determinação das transições do tipo "U".
%
% Tipos de estados de comportamento:
% WK - Awake ("2");
% SWS - Slow-wave-sleep ("3");
% REM - Rapid eye movement sleep ("4");
% WT - Whiskar-twitching ("5");
% Movimento indeterminado ("M");
% Estado indefinido/transição ("U");
% Artefacto ("N").

% Definir estados
states = '2345MUN';
wildcard_state_index = 6;
transition_matrix = zeros(size(states,2));

% abrir ficheiro, copiar string e fechar ficheiro
[filename, pathname] = uigetfile('*.txt', 'Select HYPNO file data');
fid = fopen(filename);

% definir o state actual / Evitar wildcard_state (N ou U) em primeiro lugar
pstate = strfind(states, fscanf(fid, '%c', 1));
while pstate == wildcard_state_index
    pstate = strfind(states, fscanf(fid, '%c', 1));
end

% rotina
newstate = strfind(states, fscanf(fid, '%c', 1));
while feof(fid) == 0
    % actualizar o state e a transition_matrix
    if newstate ~= wildcard_state_index & newstate ~= pstate
        transition_matrix(pstate, newstate) = transition_matrix(pstate, newstate) + 1;
        pstate = newstate;
    end
    newstate = strfind(states, fscanf(fid, '%c', 1));
end

[filename, pathname] = uiputfile(['*.txt'], 'Save as'); save(filename, 'transition_matrix', '-ascii');

imagesc(transition_matrix), colorbar

% fechar ficheiro
fclose(fid);
```

A.5. Função noState

```
% Function noState
%
% Contagem do número de ocorrências de cada estado de comportamento por
% registo neuronal.
%
% Estados em análise WK, SWS, REM, WT, M, U (em duas opções).
%
% Codificação ASCII dos estados de comportamento:
%   WK, 50
%   SWS, 51
%   REM, 52
%   WT, 53
%   M, 77
%   U, 85
%
% A função considera duas variantes:
%
% 1) Na qual o estado U é considerado um estado independente
% 2) Na qual o estado U não é considerado um estado, mas sim um prolongar
% do estado de comportamento que o precede, nesse caso correr a função
% "noStateNoU.m".
%
% Nota: O ficheiro de data 'Hypnogram' deverá estar em representação ASCII
%
% Helder Cruz 2007/03/29

function noState

% Definição do número de estados possíveis
states =6;
wildcard_state_index=6;
OutputResults=zeros(1,6);

% Abrir ficheiro com o "Hypnogram" de BIN=ls
[filename, pathname]=uigetfile('.txt','Selecionar ficheiro de Hypnograma');
if ~ischar(filename),return,end

longfilename=strcat(pathname,filename);
dataHYPNO=load(longfilename,'-ascii');
lengthHYPNO=length(dataHYPNO);

% para WK
dataWK=dataHYPNO;
for i=1:lengthHYPNO
    if dataWK(1,i)==50;
        dataWK(1,i)=50;
    else
        dataWK(1,i)=0;
    end
end
%Número de BINS totais:
sumWK=sum(dataWK)/50
countWK=0;

for i=1:lengthHYPNO-1

    countWK=countWK
    if dataWK(1,i)==50&dataWK(1,i+1)==50
        countWK=countWK
    elseif dataWK(1,i)==50&dataWK(1,i+1)==0
        countWK=countWK+1
    elseif dataWK(1,i)==0&dataWK(1,i+1)==0
        countWK=countWK
    end
end
OutputResults(1,1)=countWK

% para SWS
dataSWS=dataHYPNO;
for i=1:lengthHYPNO
    if dataSWS(1,i)==51;
        dataSWS(1,i)=51;
    else
        dataSWS(1,i)=0;
    end
end
%Número de BINS totais:
sumSWS=sum(dataSWS)/51
countSWS=0;
```

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuroniais

```

for i=1:lengthHYPNO-1

    countSWS=countSWS
    if dataSWS(1,i)==51&dataSWS(1,i+1)==51
        countSWS=countSWS
    elseif dataSWS(1,i)==51&dataSWS(1,i+1)==0
        countSWS=countSWS+1
    elseif dataSWS(1,i)==0&dataSWS(1,i+1)==0
        countSWS=countSWS
    end

end
OutputResults(1,2)=countSWS

% para REM
dataREM=dataHYPNO;
for i=1:lengthHYPNO
    if dataREM(1,i)==52;
        dataREM(1,i)=52;
    else
        dataREM(1,i)=0;
    end
end
%Número de BINS totais:
sumREM=sum(dataREM)/51
countREM=0;

for i=1:lengthHYPNO-1

    countREM=countREM
    if dataREM(1,i)==52&dataREM(1,i+1)==52
        countREM=countREM
    elseif dataREM(1,i)==52&dataREM(1,i+1)==0
        countREM=countREM+1
    elseif dataREM(1,i)==0&dataREM(1,i+1)==0
        countREM=countREM
    end

end
OutputResults(1,3)=countREM

% para WT
dataWT=dataHYPNO;
for i=1:lengthHYPNO
    if dataWT(1,i)==53;
        dataWT(1,i)=53;
    else
        dataWT(1,i)=0;
    end
end
%Número de BINS totais:
sumWT=sum(dataWT)/53
countWT=0;

for i=1:lengthHYPNO-1

    countWT=countWT
    if dataWT(1,i)==53&dataWT(1,i+1)==53
        countWT=countWT
    elseif dataWT(1,i)==53&dataWT(1,i+1)==0
        countWT=countWT+1
    elseif dataWT(1,i)==0&dataWT(1,i+1)==0
        countWT=countWT
    end

end
OutputResults(1,4)=countWT

% para M
dataM=dataHYPNO;
for i=1:lengthHYPNO
    if dataM(1,i)==77;
        dataM(1,i)=77;
    else
        dataM(1,i)=0;
    end
end
%Número de BINS totais:
sumM=sum(dataM)/77
countM=0;

for i=1:lengthHYPNO-1

    countM=countM
    if dataM(1,i)==77&dataM(1,i+1)==77
        countM=countM
    end
end

```

Capítulo VII – Anexos

As oscilações tálamo-corticais: algoritmos para pesquisa de padrões neuronais

```
elseif dataM(1,i)==77&dataM(1,i+1)==0
    countM=countM+1
elseif dataM(1,i)==0&dataM(1,i+1)==0
    countM=countM
end

end
OutputResults(1,5)=countM

% para U - Transição/Estado indefinido
dataU=dataHYPNO;
for i=1:lengthHYPNO
    if dataU(1,i)==85;
        dataU(1,i)=85;
    else
        dataU(1,i)=0;
    end
end
%Número de BINS totais:
sumU=sum(dataU)/85
countU=0;

for i=1:lengthHYPNO-1

    countU=countU
    if dataU(1,i)==85&dataU(1,i+1)==85
        countU=countU
    elseif dataU(1,i)==85&dataU(1,i+1)==0
        countU=countU+1
    elseif dataU(1,i)==0&dataU(1,i+1)==0
        countU=countU
    end

end
OutputResults(1,6)=countU

disp('WK SWS REM WT M U')
OutputResults

imagesc(OutputResults)

[filename, pathname] = uiputfile( ...
{'.mat','*.txt'}, ...
'Save as'); save(filename,'OutputResults','-ascii');
```