

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Rafaela Schuttenberg Polanczyk

**PAPEL DO ACOPLAMENTO HIPOCAMPO-PRÉ-FRONTAL PARA A FORMAÇÃO  
DE MEMÓRIA ESPACIAL DURANTE O SONO**

Belo Horizonte  
2023

Rafaela Schuttenberg Polanczyk

**PAPEL DO ACOPLAMENTO HIPOCAMPO-PRÉ-FRONTAL PARA A FORMAÇÃO  
DE MEMÓRIA ESPACIAL DURANTE O SONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Professor Dr. Cleiton Lopes Aguiar

Belo Horizonte

2023

043

Polanczyk, Rafaela Schuttenberg.

Papel do acoplamento hipocampo-pré-frontal para a formação de memória espacial durante o sono [manuscrito] / Rafaela Schuttenberg Polanczyk. – 2023.  
67 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Cleiton Lopes Aguiar.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Área Pré-Tecta. 3. Sono. 4. Medida de Exposição à Radiação. 5. Memória. 6. Eletrofisiologia. I. Aguiar, Cleiton Lopes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 580 DE **RAFAELA SCHUTTENBERG POLANCZYK**

Às 08:00 horas do dia 07 do mês de dezembro de 2023, no Transmited via plataforma Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Rafaela Schuttenberg Polanczyk**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Daniel Almeida Filho**, Centro Universitário SENAI CIMATEC, **Profa. Dra. Ana Clara Brogгинi**, Ernst Strüngmann Institute ESI e **Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Papel do Acolpamento Hipocampo-pré-frontal Para A Formação de Memória Espacial Durante O Sono**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 07 de dezembro de 2023.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 15/12/2023, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Clara Silveira Broggin, Usuária Externa**, em 19/12/2023, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Gomes de Almeida Filho, Usuário Externo**, em 19/12/2023, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2901463** e o código CRC **008124C9**.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao Professor Cleiton, pelos seis anos de ensinamentos, paciência e orientação ao longo da minha iniciação científica e mestrado. Foram muitos desafios e conquistas juntos, e sou grata pela confiança e motivação. Os aprendizados certamente levarei pela vida toda, especialmente sobre o fazer científico ético e aberto.

Aos meus colegas de laboratório, em especial Ikaró, Igor, Mateus e Bruno, que estão nessa jornada comigo desde que a iniciação científica, muito obrigada pela parceria. Vocês foram essenciais para esse projeto. Crescemos e aprendemos muito juntos, e espero que essa parceria perdure por muitos mais anos!

Às alunas de iniciação científica, em especial à Leandra, Beatriz e Anna, que acompanharam meu projeto mais de perto, obrigada pela ajuda e disponibilidade sempre. Vocês têm um belo caminho pela frente, e sou feliz de ter contribuído com o aprendizado científico de vocês.

Agradeço também aos meus pais, Carlos Antônio e Beatriz, e meus avós, Antônio, Terezinha, Heinrich e Mabilia. Eles sempre incentivaram os estudos, nos colocaram nas melhores escolas e auxiliaram em todas as oportunidades de ensino que tínhamos. Foi graças aos esforços e ensinamentos deles que cheguei até aqui.

Ao Gabriel, obrigada por ser meu companheiro nessa jornada, me apoiando e inspirando diariamente a ser o meu melhor.

Às minhas irmãs e amigas, vocês também fazem parte dessa história, então obrigada pelo apoio e carinho.

Aos animais que doaram suas vidas para esse projeto: sem vocês o avanço científico não seria possível em muitas áreas, e espero ter cumprido meu dever com ética e respeito.

Por fim, mas não menos importante, agradeço Alexandra Elbakyan, criadora do Sci-hub, por tornar a ciência mais aberta e democrática. Bem como Josh Siegle e Jakob Voigts por criarem um sistema de aquisição de sinal de alta qualidade e baixo custo, também contribuindo com a democratização da neurociência.

## RESUMO

Na consolidação de memórias declarativas, experiências recém codificadas se transformam em memórias disponíveis para evocação a longo prazo. Para isso, informações processadas inicialmente no hipocampo parecem ser transferidas para regiões corticais associativas, como o córtex pré-frontal (PFC). Evidências indicam que o sono teria um papel fundamental na transferência dessas informações após codificação no hipocampo. Mais especificamente, ritmos neurais presentes nas diferentes fases do sono geram padrões de sincronização que funcionariam como janelas de oportunidade para corticalização de memórias. Um exemplo disso é a oscilação teta (5-12Hz), cuja perturbação durante sono REM é suficiente para prejudicar a consolidação de memória espacial. Uma possível explicação para esse fenômeno é que a oscilação teta auxiliaria na comunicação entre diferentes regiões cerebrais, como CA1 do hipocampo e o córtex pré-frontal medial (mPFC). Portanto, a perturbação dessa comunicação hipocampo-cortical durante sono REM deveria ser suficiente para prejudicar a consolidação de memórias espaciais. No entanto, esta hipótese ainda não foi testada diretamente. Como um primeiro passo nesse sentido, investigamos se existe alguma associação significativa entre padrões oscilatórios durante sono REM e consolidação de memória de localização de objetos. Para isso, ratos Wistar machos adultos foram implantados com eletrodos no mPFC e em CA1 do hipocampo, a fim de registrar o sono e a dinâmica entre as regiões. Concomitante com os registros, os animais foram submetidos ao teste de localização de objetos. Avaliamos diversos parâmetros, tais como arquitetura do sono, padrões oscilatórios locais e medidas de sincronia entre as regiões de interesse antes e depois da fase de aquisição da tarefa de memória. Além disso, buscamos correlacionar tais medidas durante o sono, principalmente do sono REM, com o desempenho dos animais no teste. Nossos resultados indicam uma redução significativa da latência para REM no sono pós-aprendizado (-54%, teste t pareado, one-tailed,  $p=0,037$ ). Além disso, observamos uma correlação significativa (correlação de Pearson,  $p=0,04$  e  $r=0,69$ ) entre a coerência de fase hipocampo-cortical em teta durante REM e o desempenho dos animais na tarefa de memória de localização de objetos. Nossos achados estão de acordo com estudos anteriores sobre o papel do sono REM para a formação de memórias. Esperamos que nosso estudo motive futuras investigações envolvendo estratégias de manipulação seletiva da coordenação entre hipocampo e mPFC durante sono REM.

**Palavras chave**— TETA; SONO; REM; MEMÓRIA; ELETROFISIOLOGIA IN VIVO; HIPOCAMPO; CÓRTEX PRÉ-FRONTAL; COERÊNCIA

## ABSTRACT

For declarative memory consolidation, recently encoded experiences become available for long-term memory evocation. In order for this to happen, information initially processed in the hippocampus seems to be transferred to associative cortical regions, such as the pre-frontal cortex (PFC). Scientific evidence indicates that sleep has a fundamental role in information transfer after codification in the hippocampus. More specifically, the different sleep phases' neural rhythms generate synchronization patterns that act as opportunity windows for memory corticalization. An example is the theta oscillation (5-12Hz), whose disturbance during REM sleep is sufficient to impair spatial memory consolidation. A possible explanation for this phenomenon is that theta oscillations would aid the communication between different brain regions, such as hippocampal CA1 and the medial prefrontal cortex (mPFC). Therefore, disruption of this hippocampal-cortical communication during REM sleep could be sufficient to impair spatial memory consolidation. However, this hypothesis has not been directly tested. As a first step in this direction, we investigated whether there is any significant association between oscillatory patterns during REM sleep and object location memory consolidation. For this, adult male Wistar rats were implanted with electrodes in the mPFC and CA1 of the hippocampus, in order to record their sleep and the dynamics between the regions. Simultaneously to the recordings, the animals were subjected to the object location test. We then evaluated several parameters, such as sleep architecture, local oscillatory patterns, and synchrony measurements between regions of interest before and after memory acquisition. Furthermore, we sought to correlate such measurements during sleep, especially REM sleep, with the animals' performance in the test. Our results indicate a significant reduction in latency to REM in post-learning sleep (-54%, paired t-test, one-tailed,  $p=0.037$ ). We also observed a significant correlation (Pearson correlation,  $p=0.04$  and  $r=0.69$ ) between hippocampal-cortical phase coherence in theta during REM and the animal's performance in the object location memory task. Our findings are in line with previous studies on the role of REM sleep in memory formation. We hope that our study motivates future investigations involving strategies for selectively manipulating the coordination between the hippocampus and mPFC during REM sleep.

**Keywords**— *THETA; SLEEP; REM; MEMORY; IN VIVO ELECTROPHYSIOLOGY; HIPPOCAMPUS; PREFRONTAL CORTEX; COHERENCE*

## **Lista de Figuras**

- Figura 1. Oscilações do sono.
- Figura 2. Corticalização de memórias durante o sono.
- Figura 3. Resumo da estratégia experimental.
- Figura 4. Análises no Matlab.
- Figura 5. Análises de Coerência.
- Figura 6. Histologias.
- Figura 7. Índices de discriminação.
- Figura 8. Classificação do sono.
- Figura 9. Variação de teta e delta pelo tempo.
- Figura 10. Arquitetura do sono.
- Figura 11. Detecção de ripples.
- Figura 12. Densidade Espectral da Potência (PSDs).
- Figura 13. Coerências de fase e espectral.
- Figura 14. Causalidade de Granger.
- Figura S1. Comparação de DI com bibliografia.
- Figura S2. Padronização de testes comportamentais.
- Figura S3. Detecção de teta.



## **Lista de Abreviaturas**

- AP - ântero-posterior
- AWAKE - estado de vigília
- BL - Linha de base (Baseline)
- CEBIO - Centro de Bioterismo do ICB-UFMG
- CEUA - Comitê de Ética no uso de Animais
- DI - Índice de discriminação (discrimination index)
- DV - dorso-ventral
- EEG - Eletroencefalograma
- FP - Falso positivo (false positive)
- FPR - Taxa de falso positivo (false positive rate)
- GMM - Modelo de Misturas Gaussianas (gaussian mixture model)
- LANEC - Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular da UFMG
- LFP - Potencial de campo local (local field potential)
- LTD - Depressão de Longo Prazo (long-term depression)
- LTP - Potenciação de Longo Prazo (long-term potentiation)
- ML - médio-lateral
- mPFC - Córtex pré-frontal medial (medial pre-frontal cortex)
- PFA - Paraformaldeído 4
- PFC - Córtex pré-frontal (pre-frontal cortex)
- PL - Pós-aprendizado (post learning)
- PSD - Densidade espectral de potência (power spectral density)
- q.s.p. - quantidade suficiente para
- REM - Sono de movimento rápido dos olhos (rapid eye movement)
- RMS - raiz do valor quadrático médio (root mean square)
- ROC - Receiver Operating Characteristic
- SD - Desvio padrão (standard deviation)
- SHY - Hipótese da homeostase sináptica (synaptic homeostasis hypothesis)
- SWS - Sono de ondas lentas (slow wave sleep)
- T/D - Razão de teta sobre delta
- TLEO - Teste de localização espontânea de objetos
- TLO - Teste de localização de objetos

TP - Verdadeiro positivo (true positive)

TPR - Taxa de verdadeiro positivo (true positive rate)

VAR - Modelos vetoriais autorregressivos

## Conteúdo

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	Introdução e antecedentes científicos . . . . .	13
1.1.1	Memória . . . . .	13
1.1.2	Sono . . . . .	15
1.1.3	Papel mnemônico do sono . . . . .	16
1.1.4	Relevância . . . . .	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
2.1	Objetivos gerais . . . . .	20
2.2	Objetivos específicos . . . . .	20
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>21</b>
3.1	Sujeitos experimentais . . . . .	21
3.2	Procedimento cirúrgico . . . . .	21
3.2.1	Anestesia . . . . .	21
3.2.2	Cirurgia estereotáxica e implante de eletrodos . . . . .	22
3.3	Registro eletrofisiológico . . . . .	23
3.4	Teste de localização de objetos . . . . .	23
3.5	Lesão eletrolítica, perfusão e fixação do tecido nervoso . . . . .	25
3.6	Histologia . . . . .	25
3.7	Análises no Matlab . . . . .	25
3.7.1	Conversão de dados . . . . .	25
3.7.2	Classificação de sono . . . . .	26
3.7.3	Arquitetura do sono . . . . .	28
3.7.4	Latência para o sono . . . . .	29
3.7.5	Detecção de <i>ripples</i> . . . . .	29
3.7.6	Densidade espectral de potência (PSD) . . . . .	30
3.7.7	Coerência espectral . . . . .	30
3.7.8	Coerência de fase . . . . .	31
3.7.9	Causalidade de Granger . . . . .	31

<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
4.1	Histologias . . . . .	33
4.2	Calculo do índice de discriminação para o TLO . . . . .	33
4.3	Caracterização eletrofisiológica do ciclo sono-vigília . . . . .	34
4.4	Arquitetura do sono . . . . .	35
4.5	Separação dos canais inseridos em CA1 utilizando <i>ripples</i> . . . . .	38
4.6	Densidade espectral da potência (PSD) antes e depois do aprendizado . . . . .	39
4.7	Coerência de fase e espectral antes e depois do aprendizado. . . . .	41
4.8	Causalidade de Granger. . . . .	44
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
5.1	A arquitetura de REM e a redução da latência para o sono REM pós-aprendizado	46
5.2	Arquitetura de NREM e a redução do número de bouts de NREM pós-aprendizado	48
5.3	Padrões oscilatórios, sono e memória. . . . .	49
5.4	A coerência de teta e delta e a correlação entre a coerência de fase em teta durante REM com o índice de discriminação. . . . .	50
5.5	As implicações da causalidade de Granger. . . . .	52
5.6	Limitações do estudo. . . . .	53
5.7	Conclusões e próximos passos. . . . .	54
<b>6</b>	<b>MATERIAL SUPLEMENTAR</b>	<b>55</b>
6.1	Padronização de testes de memória espacial . . . . .	55
6.1.1	Teste de Localização de Objetos com dupla exposição . . . . .	56
6.1.2	Teste de localização espontânea de objetos (spontaneous location recog- nition task em inglês). . . . .	56
6.1.3	Labirinto de Barnes . . . . .	57
6.2	Detecção de teta . . . . .	58
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>62</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Introdução e antecedentes científicos

### 1.1.1 Memória

Aprendizagem e memória são capacidades indispensáveis para a sobrevivência dos animais. O bom funcionamento da memória de longo prazo depende de três fases: aquisição, consolidação e evocação (Kandel e Squire, 2000; Medina, 2008). Nesse processo, experiências motoras, sensoriais e cognitivas são adquiridas e armazenadas para uso futuro, podendo ser evocadas após o período de consolidação. A consolidação é um processo no qual experiências recém codificadas e instáveis se transformam em memórias mais estáveis e disponíveis para evocação por um longo prazo (Buzsáki, 1989). O acesso a essas informações é essencial para tomada de decisões adaptativas (Biderman *et al.*, 2020) e, por isso, compreender os mecanismos subjacentes a atividades mnemônicas é um problema fundamental na biologia.

Em meados do século XX, houve um grande avanço na elucidação da consolidação de memória. Na década de 30, Rafael Lorente de Nó desenvolveu a eletrofisiologia a fim de estudar a reativação de circuitos neuronais fechados, que ele chamava de circuitos reverberantes. A partir dessa ideia, Donald Hebb propôs que as reverberações elétricas fossem uma forma de consolidar memórias, fazendo neurônios se ativarem em sincronia, fortalecendo suas conexões e aumentando sua excitabilidade (Donald O. Hebb, 1949). No entanto, até então não haviam evidências empíricas correlacionando os circuitos reverberantes com a consolidação de memórias. Dessa forma, ainda era muito limitada a compreensão do que são memórias, onde são armazenadas e como o cérebro as gerencia.

A partir da década de 50, entrou em evidência a importância de processos que ocorrem no hipocampo, após a publicação do caso do paciente H.M, um marco da neurociência (Scoville e Milner, 1957). O paciente H.M., após passar por uma lobotomia temporal bilateral a fim de tratar seu quadro epiléptico, parou de formar novas memórias, apesar de manter lembranças antigas, sugerindo um papel de estruturas como o hipocampo na consolidação de memórias declarativas. Em especial, a partir de 1973 e 1982, com as descobertas respectivamente da Potenciação de Longo Prazo (LTP, do inglês long-term potentiation) e da Depressão de Longo Prazo (LTD, do inglês long-term depression) no hipocampo, foi possível compreender algumas das alterações físicas que acontecem nos neurônios, e reforçou a importância dessa região para processos de aprendizado e memória (Berlucchi, e Buchtel, 2008; von Bernhardi, *et al.*, 2017). A LTP e a

LTD são definidas como o fortalecimento ou enfraquecimento de conexões sinápticas, sendo, portanto, possíveis substratos celulares do processo de formação de memória (Bliss e Lømo, 1973; Cooke e Bliss, 2006).

Atualmente, a hipótese mais aceita em relação a formação de memórias declarativas sustenta que as informações são inicialmente processadas em áreas corticais e hipocampo, durante a fase de aquisição. Em seguida, durante a consolidação, os traços de memória já existentes no córtex associativo, como o córtex pré-frontal (PFC), são reativados pelo hipocampo para armazenamento a longo prazo (Buzsáki, 1989; Eichenbaum, 2001; Reiner *et al.*, 2014; Diekelmann e Born, 2010; Kitamura *et al.*, 2017). Consistente com essa hipótese, a perturbação da comunicação hipocampo-pré-frontal é capaz de gerar prejuízos na consolidação de memórias, principalmente em experimentos com roedores (Floresco *et al.*, 1997). No entanto, ainda não se sabe como essas diferentes regiões cerebrais contribuem para os mecanismos subjacentes à consolidação e evocação de memórias de longo prazo (Siapas *et al.*, 2005; Bontempi e Durkin, 2007), e principalmente como se dá a transferência de informações entre diferentes regiões.

Existe um corpo significativo de evidências indicando que processos de consolidação de memórias, principalmente declarativas, ocorrem durante o sono, após codificação no hipocampo (Reiner *et al.*, 2014; Diekelmann e Born, 2014). A reativação de circuitos hipocampais durante o sono e períodos de vigília de baixa atividade parece estar subjacente a esse processo (Rasch e Born, 2007; Klinzing *et al.*, 2019). Essa reativação está atrelada principalmente à relevância da informação (Klinzing *et al.*, 2019), mas também está ligada à valência emocional do ambiente, sendo observada maior reativação durante o sono após contato com ambientes associados a respostas emocionais aversivas ou de recompensa (Girardeau *et al.*, 2017; Singer e Frank, 2009). Esse replay de atividade hipocampal durante o sono também promove reativação de conjuntos neuronais do PFC (Todorova e Zugaro, 2019), sendo essa comunicação essencial no processo de corticalização de memórias de longo prazo (transferência de representações de memória do hipocampo para regiões corticais). Estudos de ressonância magnética em humanos, por exemplo, mostraram que esse processo de corticalização de fato é influenciado pelo sono (Gais *et al.*, 2007; Takashima *et al.*, 2009). Gais *et al.* (2007), demonstraram que o hipocampo é mais ativo até dois dias depois de uma tarefa de aprendizado quando o sujeito experimental dorme, ao mesmo tempo que modula atividades do córtex pré-frontal medial (mPFC). Ademais, os resultados de Takashima *et al.* (2009), mostraram que, com o tempo, as memórias passam a depender menos do hipocampo, com maior atividade do PFC após o processo de consolidação,

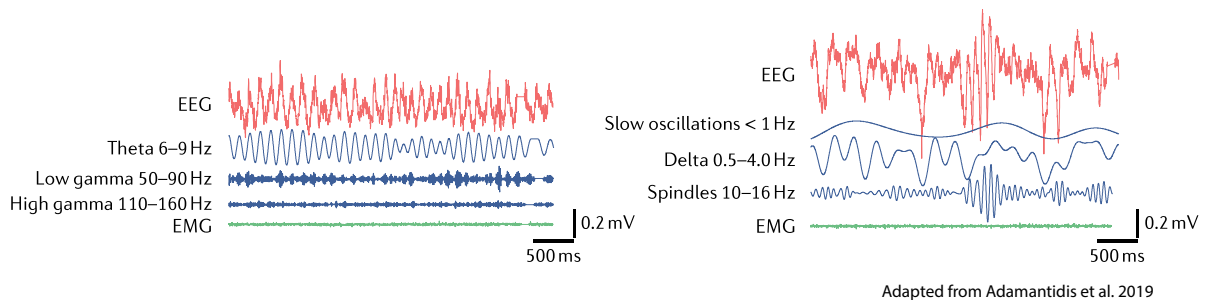
principalmente dependente de sono. Portanto, hipotetiza-se que a reativação repetida de uma representação neural hipocampal durante o sono se propaga pela circuitaria associativa, sendo distribuída por componentes neocorticais. Essa coativação é importante em processos sinápticos como a LTP e a LTD que provocam a consolidação de memórias no neocórtex (Klinzing *et al.*, 2019), e estudos apontam que cada estágio do sono contribui de forma diferente nessa comunicação hipocampo-cortical (Seibt e Frank, 2019).

### 1.1.2 Sono

Por muitos séculos, acreditava-se que o sono era um estado de inatividade induzido pela ausência de estímulos, e estudos acerca desse momento fisiológico se limitavam aos sonhos e suas possíveis associações com transtornos psiquiátricos (Ribeiro, 2019). Com o advento da eletrofisiologia na década de 30, criada por Rafael Lorente de Nó e do eletroencefalograma com Hans Berger, foi possível se aprofundar no estudo da atividade neural (Ribeiro, 2019). Dessa forma, em meados do século XX Nathaniel Kleitman e Eugene Aserinsky observaram em humanos a existência de períodos de sono agitado, com ondas cerebrais mais rápidas, além de movimentação dos olhos, respiração acelerada e batimento cardíaco irregular (Aserinsky e Kleitman, 1953), padrão que também foi observado por Jouvett, quem cunhou o termo “sono paradoxal” devido à semelhanças eletroencefalográficas com o estado acordado. À esses períodos, foi dado o nome de sono de movimento rápido dos olhos (REM, do inglês, rapid eye movement), e os momentos de maior quietude foi chamado de não-REM (NREM). Esse achado mudou a concepção sobre o sono, demonstrando que apesar da quietude aparente, há uma variedade de atividades fisiológicas acontecendo no cérebro e no corpo (Ribeiro, 2019).

A partir desse momento, surgiram diversas linhas de pesquisa buscando entender mecanismos subjacentes ao sono, bem como suas diferentes características e possíveis funções. Atualmente, sabe-se que o sono dos mamíferos é dividido em dois principais estágios: o sono REM e sono de ondas lentas (SWS, do inglês, slow wave sleep; ou não-REM (NREM)). Os sonos REM e NREM podem ser diferenciados entre si pelas diferentes oscilações presentes no eletroencefalograma (EEG) ou no potencial de campo local (LFP, do inglês, local field potential), além de serem utilizados métodos como medição de tônus muscular, movimento dos olhos, ritmo cardíaco e respiratório para a identificação do estágio em que o sujeito experimental se encontra (Klinzing *et al.*, 2019). Enquanto no sono NREM de roedores há prevalência de osci-

lações de baixa frequência (0.5-4Hz) e altas amplitudes, conhecidas como oscilações delta, com ocasionais spindles (12-15Hz) e ripples hipocampais (120-250 Hz), no sono REM há presença de frequências mais altas com amplitudes em regiões corticais mais baixas, e prevalência de oscilações teta (4-10 Hz) no hipocampo (Marshall *et al.*, 2019; Klinzing *et al.*, 2019). Ademais, no sono REM há o típico movimento rápido dos olhos, aceleração do ritmo cardíaco e respiratório e perda do tônus muscular (Klinzing *et al.*, 2019; Le Bom, 2021) (**Figura 1**).



Adapted from Adamantidis *et al.* 2019

**Figura 1:** À esquerda, o perfil das oscilações durante o sono REM de roedores: do EEG hipocampal, de teta (Theta), de baixo gama (low gamma), de alto gama (high gamma) e do eletromiograma (EMG). Percebe-se uma alta potência de teta, no eletroencefalograma, e uma baixa potência do sinal do eletromiograma. À direita, o perfil das oscilações durante o sono NREM: do EEG hipocampal, de oscilações lentas (slow oscillations), delta, spindles e EMG. Há uma maior prevalência de oscilações lentas, bem como spindles no EEG, e uma baixa potência do sinal de EMG. Adaptado de Adamantidis *et al.* (2019).

### 1.1.3 Papel mnemônico do sono

As primeiras evidências experimentais a respeito do papel do sono na cognição são relatadas por John Jenkins e Karl Dallenbach na década de 20, que avaliaram a retenção de memória de diversos voluntários quando eram mantidos despertos ou quando eram mantidos dormindo. Neste trabalho, foi visto que a retenção após o sono era maior que a retenção após vigília (Jenkins e Dallenbach, 1924). No entanto, esses resultados não foram replicados em experimentos posteriores, e só em 1960, com Michel Jouvet e o método do vaso invertido, é que o interesse do papel do sono no aprendizado ressurgiu (Ribeiro, 2019). Neste paradigma, ratos são colocados em plataformas circundadas por água, mas com a perda do tônus muscular durante o REM os animais caem e, ao entrar em contato com a água, acordam. Diversos estudos demonstraram que essa privação de sono resulta em déficits de evocação de memória (Juvet *et al.*, 1964; Pearlman, 1969). No entanto, este protocolo possui falhas ao desconsiderar os efeitos do estresse e impedir o animal de realizar comportamentos habituais, tornando questionáveis os resultados obtidos. Ademais, perguntas acerca da presença ou não do sono REM em diferentes espécies aumentou



o ceticismo em relação à importância desse estado para a formação de memória.

Em 1970, o interesse pelo sono REM também tomou outro rumo quando Winson começou a desvendar o ritmo teta presente no hipocampo durante a vigília e o sono REM. Por meio de estudo com diversas espécies, ele propôs que o teta durante REM era um estado fisiológico no qual o cérebro processava memórias adquiridas em vigília. Para testar sua hipótese, Winson realizou um experimento onde lesionou o septo medial de ratos, região responsável pela geração das oscilações teta, observando uma perda de memória espacial em ratos (Winson, 1978). Esse achado foi o primeiro a demonstrar o papel do ritmo teta para a memória. Alguns anos depois, os estudos de Winson, juntamente com Constantine Pavlides, comparando o estado acordado com o sono REM resultaram na confirmação da existência de neurônios de lugar (place cells), previamente postuladas por O'Keefe e Dostrovsky em 1971 (O'Keefe e Dostrovsky, 1971). As place cells são neurônios piramidais hipocampais que se ativam em resposta a determinado campo espacial, e Winson e Pavlides observaram que aquelas que haviam se ativado mais durante vigília eram também as que mais se ativaram durante o sono REM e NREM (Pavlides e Winson, 1989). Esse estudo foi a primeira evidência eletrofisiológica para sustentar a ideia de que a atividade neuronal durante o sono reflete aquela presente durante a vigília.

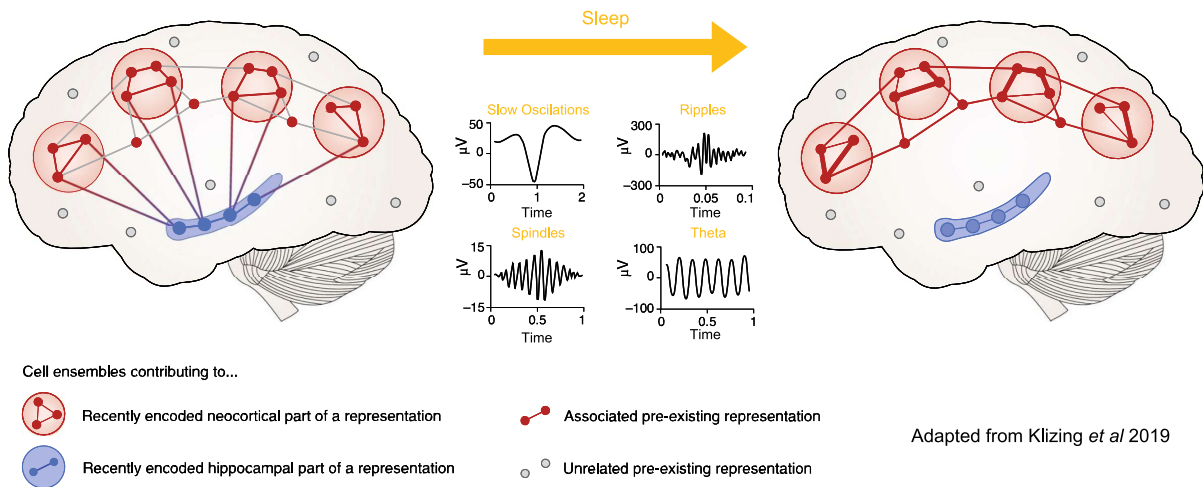
Atualmente, sabe-se que as oscilações e ritmos neurais presentes durante o sono podem gerar diferentes padrões de sincronização que são correlacionadas com processos cognitivos específicos (Reiner *et al.*, 2014; Girardeau e Lopes-dos-Santos, 2021) (**Figura 2**). Enquanto que, para o sono NREM, há evidências mostrando que oscilações como as ripples, delta e spindles estão associadas à reativação hipocampal e transferência de informações para o córtex, o papel do REM para memória ainda não é tão bem compreendido (Hutchinson e Rathore, 2015; Boyce *et al.*, 2016; Adamantidis *et al.*, 2019; Girardeau e Lopes-dos-Santos, 2021). Uma das possibilidades é que o sono REM permita a integração e recombinação de traços de memória no neocórtex previamente consolidados durante o sono NREM, contribuindo com o fortalecimento de alguns traços de memória. Outros estudos sustentam a ideia de que esta fase do sono também pode estar envolvida com processos relacionados à transferência de memórias entre hipocampo e córtices associativos (Hutchinson e Rathore, 2015; Almeida-Filho, 2018). De fato, pesquisas em roedores demonstram que a exposição ao aprendizado durante períodos de vigília aumenta períodos de REM (Smith, 1996). Ademais, a indução de LTP na via perforante medial e no giro denteado durante o estado acordado leva a um aumento da expressão de zif-268 em regiões extra hipocampais após ciclos subsequentes de REM (Ribeiro *et al.* 2002). O zif-268 é um gene

dependente de atividade cuja expressão é induzida em resposta à ativação sináptica de vias de transdução de cálcio, o que indica que há processos de plasticidade sináptica ocorrendo durante sono REM em resposta a eventos de LTP que ocorrem no estado acordado. Em contrapartida, há também trabalhos que demonstram como a privação do sono REM após aprendizado prejudica o desempenho em testes comportamentais de memória (Rasch e Born, 2013).

Estudos também demonstram que a perturbação de oscilações teta hipocampais durante REM provoca prejuízos na consolidação de memória (Boyce *et al.*, 2016). As oscilações teta hipocampais prevalentes durante REM são geradas a partir da atividade rítmica de neurônios GABAérgicos do Septo Medial, que atuam como um “marca-passo”, inibindo interneurônios do hipocampo (Adamantidis *et al.*, 2019). Evidências apontam para um importante papel dessa oscilação na consolidação de memórias contextuais (Adamantidis *et al.*, 2019), observando-se uma reativação de place cells hipocampais em fase com teta (Diekelmann e Born, 2014). Em um trabalho de Boyce *et al.* (2016), a atenuação de oscilações teta durante o sono REM por meio de inibição optogenética do Septo Medial, provocou prejuízos na consolidação de memória de localização de objetos dos animais experimentais. No mesmo trabalho, também foi vista a importância desse ritmo na consolidação de memória contextual aversiva, com prejuízos na sua evocação após inibição do septo medial, sugerindo um papel importante de teta hipocampal para a formação de memórias emocionais contextuais (Boyce *et al.*, 2016). Ainda, em trabalho de 2021, Almeida-Filho *et al.* viram que o teta hipocampal durante REM depois de treinamento em memória aversiva parece estar relacionado com consolidação e corticalização dessa memória para o córtex retrosplenial (Almeida-Filho *et al.*, 2021), e a sincronização entre essas áreas se correlacionou com a expressão da memória aversiva. Ademais, estudos apontam para a importância do acoplamento em fase de teta hipocampal com outras oscilações mais rápidas, como gamma (30-120Hz), para o processamento de informações adquiridas durante vigília (Canolty e Knight, 2010).

Apesar de existir um corpo significativo de evidências a respeito do papel das oscilações teta em processos mnemônicos, ainda não está claro se estas oscilações durante o sono REM seriam essenciais para o processo de corticalização de memórias. Ao estudar mais a fundo este fenômeno, esperamos observar alterações na conectividade entre córtex e hipocampo em decorrência do aprendizado, bem como alterações na arquitetura do sono, apontando para uma maior eficiência de REM. Dessa forma, este trabalho pretende contribuir com evidências acerca da função do sono REM no aprendizado, bem como o papel de oscilações teta na transferência

de informações do hipocampo para o córtex pré-frontal.



**Figura 2:** Ao adquirir as memórias, elas inicialmente dependem da ativação hipocampal para sua evocação, como podemos ver no cérebro retratado do lado esquerdo, onde representações neurais recentemente codificadas no hipocampo, em azul, estão ainda interligadas com as representações neurais recentemente codificadas no neocórtex, em vermelho. Com o passar do tempo, as memórias passam a não depender mais do hipocampo para sua evocação, como retratado no cérebro do lado direito, no qual as representações neurais no neocórtex se estabilizaram. Para esse processo de corticalização, diferentes oscilações do sono, como oscilações lentas (slow oscillations), spindles, ripples, e oscilações teta (theta) estão envolvidas. Figura adaptada de Klinzing *et al.* (2019).

#### 1.1.4 Relevância

A importância do sono pode ser percebida por todos diariamente. Entretanto, os mecanismos responsáveis pelos processos de formação de memória durante o sono ainda são pouco compreendidos. Ademais, diversos estudos já demonstram como a qualidade do sono apresenta-se impactada em diferentes condições como: Alzheimer, Parkinson, síndrome de Wernicke-Korsakoff e esquizofrenia (Pause *et al.*, 2013; Dalgalarondo, 2018). A elucidação desses mecanismos possibilitaria o desenvolvimento de novos fármacos, tratamentos, hábitos, tecnologias e políticas públicas para melhoria da qualidade de vida em diferentes contextos: no desempenho escolar e laboral; em pacientes com transtornos psiquiátricos; na prevenção de acidentes que envolvem trabalhadores noturnos; em variáveis que impactam a capacidade de memória; e na melhora da qualidade de sono no geral.

Mais especificamente, o presente projeto contribui para conhecimentos básicos relevantes para o avanço no campo da neurofisiologia do sono e memória, buscando compreender: 1) como ocorre a comunicação entre hipocampo e mPFC durante o sono REM; 2) qual o papel de teta durante REM para a comunicação hipocampo-mPFC; 3) se há correlação entre desempenho

em tarefas cognitivas e padrões oscilatórios presentes no sono REM.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Este trabalho teve como objetivo investigar o papel da comunicação entre hipocampo e córtex pré-frontal medial durante o sono REM para a consolidação da memória espacial.

### **2.2 Objetivos específicos**

Especificamente, testamos, em ratos Wistar, se existe correlação entre a arquitetura do sono e eventos eletrofisiológicos com o desempenho animal em tarefa de memória espacial. Em especial, avaliamos a sincronia entre mPFC e CA1 antes e após aprendizado.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Sujeitos experimentais**

Para os experimentos, foram utilizados 14 ratos da linhagem Wistar, adultos machos, procedentes do Centro de Bioterismo do ICB-UFMG (CEBIO). Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular da UFMG (LANEC) em caixas de polipropileno (41 x 34 x 18 cm; 2 animais por caixa), com maravalha no assoalho e ração balanceada e água ad libitum. Foi estabelecido um ciclo de 12h claro/escuro e controle de temperatura entre 20°C - 25°C. Todos os protocolos foram aprovados pela Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA: 41/2017). Durante a estadia no biotério de experimentação do LANEK, os animais passaram por 10 minutos de handling por dia, a fim de se habituar com o experimentador e os diferentes protocolos de manuseio pelos quais iriam passar.

Dentre os 14 animais, 7 foram excluídos das análises por diferentes motivos: 1) animais 1 à 3 foram testes iniciais do sistema de registro e não passaram pelo protocolo comportamental; 2) animais 5 e 7 não se recuperaram bem após os procedimentos cirúrgicos e foram eutanasiados antes de passarem pelo protocolo comportamental; 3) animal 8 apresentou muito ruído no sinal, impossibilitando a análise dos dados; 4) animal 12 passou por protocolo comportamental diferente.

#### **3.2 Procedimento cirúrgico**

##### **3.2.1 Anestesia**

Para anestesia geral, foi utilizado cetamina (cloridrato cetamina a 10%, diluída veículo estéril q.s.p) e a xilazina (cloridrato xilazina a 2%, diluída veículo q.s.p), aplicadas por via intraperitoneal e intramuscular. A dosagem de droga a ser recebida por animal foi calculada de acordo com seu peso (1mL/Kg para cetamina e 0,5mL/Kg para xilazina), sendo a dose inicial de 0,7 mL/Kg de cetamina e 0,35 mL/Kg de xilazina (70% da dose) por via intraperitoneal. Após 10 minutos da sedação inicial, um complemento de 0,5 ml/kg de cetamina e 0,25 ml/kg de xilazina (50% da dose) foi administrada por via intramuscular. A sedação dos animais foi verificada através da observação da ausência de resposta após pinçamento da cauda do animal. Ao longo da cirurgia, foram aplicadas doses de complemento de 30% de cetamina conforme a resposta animal. Além disso, foi utilizado lidocaína (2% em solução de NaCL 0,15M) para anestesia local na região de

incisão no escalpo.

### 3.2.2 Cirurgia estereotáxica e implante de eletrodos

Inicialmente, foi realizada a tricotomia do escalpo utilizando um aparelho de barbear, seguido da fixação da cabeça do animal no aparato estereotáxico (KOPF; KOPF instruments; EUA). Após a fixação, realizou-se a assepsia do escalpo com solução de iodo, seguido da injeção de lidocaína como mencionado no tópico anterior. Após a realização de uma incisão no topo da cabeça no plano mediano, utilizou-se água oxigenada para limpeza e remoção do tecido conjuntivo na região exposta do crânio.

O posicionamento dos eletrodos no córtex pré-frontal medial (mPFC) e na região CA1 do hipocampo foi feita com base no atlas Paxinos. O bregma foi usado de referência para realização de craniotomias segundo as coordenadas: ântero-posterior (AP): -5,4 mm; médio-lateral (ML) - 4,5 mm; dorso-ventral (DV) -2,5 mm para CA1 e ântero-posterior (AP) + 3,0 mm; médio-lateral (ML) 0,5 mm; dorso-ventral (DV) -3,5 mm para o mPFC (Paxinos e Watson, 1998; Paxinos e Watson, 2017) (**Figura 3A**). Em seguida, foram realizadas craniotomias no osso occipital para inserção de parafusos de aterramento e referência, os quais foram soldados a fios de prata presos ao conector do implante final. Também foram feitas 2 craniotomias adicionais na região temporal e frontal para inserção de parafusos estruturais, aumentando a estabilidade da fixação do acrílico no capacete do implante final.

Após as craniotomias, os eletrodos foram inseridos com registro simultâneo de LFPs à medida que se aproximavam de suas respectivas regiões alvo. Dessa forma, um estereotrodo de 2 canais, com aproximadamente 1mm de distância entre as pontas, foi posicionado na camada CA1 do hipocampo, e um eletrodo monopolar no mPFC. Os eletrodos foram confeccionados no LANEC, utilizando-se fios de tungstênio encapados com teflon (60 um de diâmetro; A-M Systems, Inc., EUA). A fixação dos eletrodos no crânio foi feita com acrílico odontológico.

Ao término da cirurgia, os animais foram reidratados com injeção de 2mL de solução 0.9% de salina subcutânea. Também receberam injeção de pentabiótico (1mL/Kg) intramuscular e administração de banamine (2,5mg/Kg; analgésico) subcutânea. Ademais, ao longo de todo procedimento, os animais tiveram sua temperatura corporal monitorada por termômetro e aquecimento com manta elétrica, mantendo a temperatura em torno de 37°C.

### 3.3 Registro eletrofisiológico

Para os registros eletrofisiológicos foram utilizados a placa de aquisição e software do Open Ephys (Siegle *et al.*, 2017), uma plataforma de acesso aberto. Para isso, o implante do animal foi conectado a um adaptador omnetics, seguido de um headstage com amplificador, digitalizador e acelerômetro (RHD-2132, intan technologies), que por sua vez se conectava à placa de aquisição e ao computador. Todos os canais foram registrados com taxa de amostragem de 30KHz.

Um dia antes da coleta de dados, os animais foram habituados durante uma hora à sala e à caixa de registro de sono (caixa plástica de 20 cm de largura, 30 cm de comprimento e 40 cm de altura com maravalha no solo). No dia seguinte, havia um dia de coleta de dados de linha de base (BL), seguido de um dia de coleta de registro pós aprendizado (no caso dos animais que fizeram teste de localização de objetos) (**Figura 3B**). Os registros foram feitos no período de sono dos ratos, de 9:00 às 17:00, e os animais tinham acesso a água e alimento ad libitum.

### 3.4 Teste de localização de objetos

Neste estudo, foi escolhido o teste de localização de objetos (TLO) para averiguar a memória espacial, bem como a resposta hipocampal à exposição à tarefa. Criado por Ennaceur e Delacour, o TLO mede a preferência espontânea que roedores possuem pela novidade (Ennaceur e Delacour, 1988; Ennaceur, Neave e Aggleton, 1997). Ademais, essa tarefa já é reconhecida por depender de atividade hipocampal, região de estudo neste projeto (Denninger *et al.*, 2019; Jablonski *et al.*, 2013).

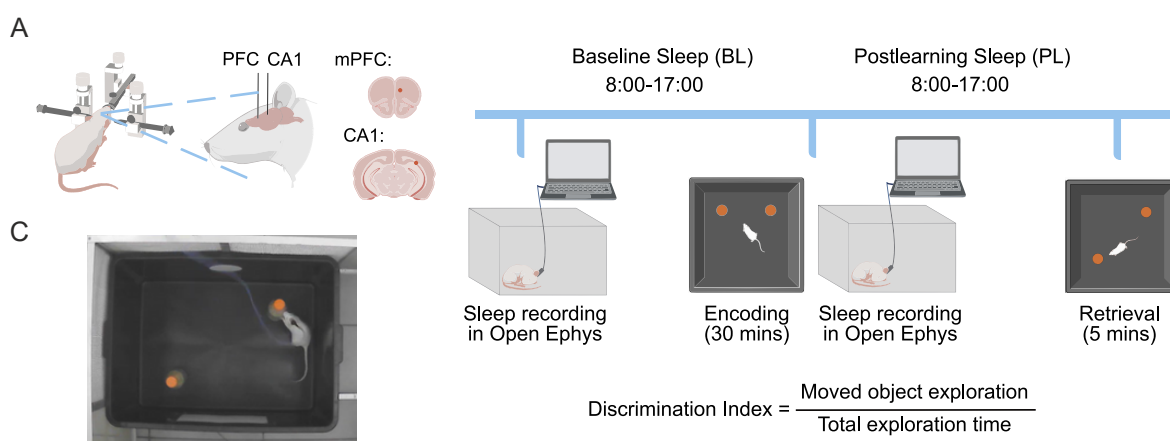
Para isso, os animais são expostos a um par de objetos idênticos durante um período de aquisição de memória, sendo permitida a livre exploração de ambos objetos. Depois de determinado tempo, é feita a evocação dessa memória, na qual um dos objetos é alterado de lugar. O aprendizado espacial é inferido pelo tempo de exploração do objeto deslocado. O TLO pode ser usado para medir memória de curta duração, com evocação ocorrendo 2-3 horas depois da aquisição, ou de longa duração, com a evocação ocorrendo 24 horas após a aquisição.

Para este projeto, foi utilizado um protocolo semelhante ao utilizado por Maingret *et al.* (2016). A arena constituía de uma caixa preta, plástica, de 60cm x 90cm com referências brancas em duas paredes (um círculo e um retângulo). A caixa foi mantida a uma luminosidade de 20 lux. Os objetos escolhidos foram duas garrafas de vidro idênticas, de aproximadamente 15cm de altura, recheadas de areia, para que os objetos não se deslocassem ou caíssem durante o teste. Acima, uma câmera foi acoplada para gravar o comportamento animal em 30 fps (**Figura 3C**).

Por dois dias antes do teste, os animais foram habituados na caixa dentro da sala de comportamento durante 30 minutos, para que a arena não fosse novidade ( $n=7$ ). Nos dois dias de teste, os animais também ficaram 30 minutos na sala de comportamento, dentro de suas próprias gaiolas, para habituação ao ambiente e luminosidade. Os testes começavam sempre entre 7:30 - 8:00 da manhã. No dia de aquisição, os objetos foram posicionados em 2 quadrantes da caixa, e os animais foram permitidos 30 minutos de exploração. Logo em seguida eles foram colocados para registrar o sono pós-aprendizagem (PL) (de 9:00-17:00). No dia seguinte, um dos objetos foi movido para outro quadrante, e os animais eram novamente expostos à arena, dessa vez por 5 minutos (**Figura 3B**).

O desempenho final do animal no teste foi calculado pelo índice de discriminação (DI), dado pela razão do tempo de exploração do objeto deslocado pelo tempo de exploração total (**Figura 3B** - equação). Para isso, os vídeos do comportamento foram analisados e o tempo de exploração foi cronometrado manualmente com auxílio de um cronômetro, como previamente protocolado no nosso laboratório (Rego, 2022).

**Figura 3:** (A): Figura ilustrativa da cirurgia estereotáxica, na qual foi implantado um eletrodo monopolar no mPFC e um estereotrodo de 2 canais em CA1 do hipocampo. (B): Desenho esquemático dos registros eletrofisiológicos intercalados pelo protocolo comportamental do TLO. Os animais passaram por um dia de registro de BL, no dia seguinte tiveram a fase de aquisição (encoding) por 30 minutos no TLO, seguido por registro PL. Por fim, tiveram o período de evocação (retrieval) por 5 minutos no terceiro dia. Abaixo, tem a fórmula utilizada para calcular o índice de discriminação (DI) dos animais na tarefa. (C): Foto de um animal realizando o teste em nosso laboratório. A caixa possui dois pontos de referência nas paredes (um círculo branco e um retângulo branco), os objetos são garrafas de vidro com cerca de 15cm de altura e ao redor da caixa, há uma gaiola de Faraday para isolar o ruído 60Hz da rede elétrica.





### 3.5 Lesão eletrolítica, perfusão e fixação do tecido nervoso

Após o último dia de registro, foi feita uma lesão eletrolítica nos eletrodos de registro para a verificação do seu posicionamento. Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina, e a estimulação foi feita na intensidade de 1mA durante 1s. Em seguida os animais receberam sobredose (3 vezes maior que a dose anestésica) de cetamina e xilazina e, após a cessação de funções vitais, foram perfundidos com uma solução tampão fosfato-salina (PBS – 250 MI) para limpar o tecido e paraformaldeído 4% (PFA – 200 MI) para fixação dos tecidos. Os encéfalos foram extraídos e imersos em uma solução de PFA a 4%. No dia seguinte, iniciou-se o protocolo de crioproteção, utilizando soluções alternadas de sacarose 10, 20 e % a cada dia por três dias. Em seguida, os cérebros foram congelados por submersão em isopentano ( 40s) e armazenados em freezer -80 °C até o momento da histologia.

### 3.6 Histologia

Os encéfalos congelados passaram por cortes transversais de 40 µm no criostato em busca das regiões com lesão eletrolítica. As fatias foram colocadas em lâminas previamente gelatinizadas com auxílio de um pincel.

Posteriormente, os fragmentos foram processados seguindo um protocolo histológico que inclui etapas de desidratação em álcool, coloração com cresil violeta e diafanização em xilol. O protocolo para a técnica de cresil violeta envolveu banhos sequenciais em álcool a 100%, 90%, 80%, 70% e água, seguidos por uma imersão em uma solução de cresil violeta por 4 minutos. Após a coloração, os tecidos foram reidratados por meio de etapas de imersão em água destilada, álcool absoluto, álcool e xilol (1:1) e xilol puro, cada etapa com duração de três minutos. Finalmente, as lâminas foram montadas com Permunt e lamínulas. Esse procedimento garante a preservação das amostras e permite a visualização da lesão eletrolítica.

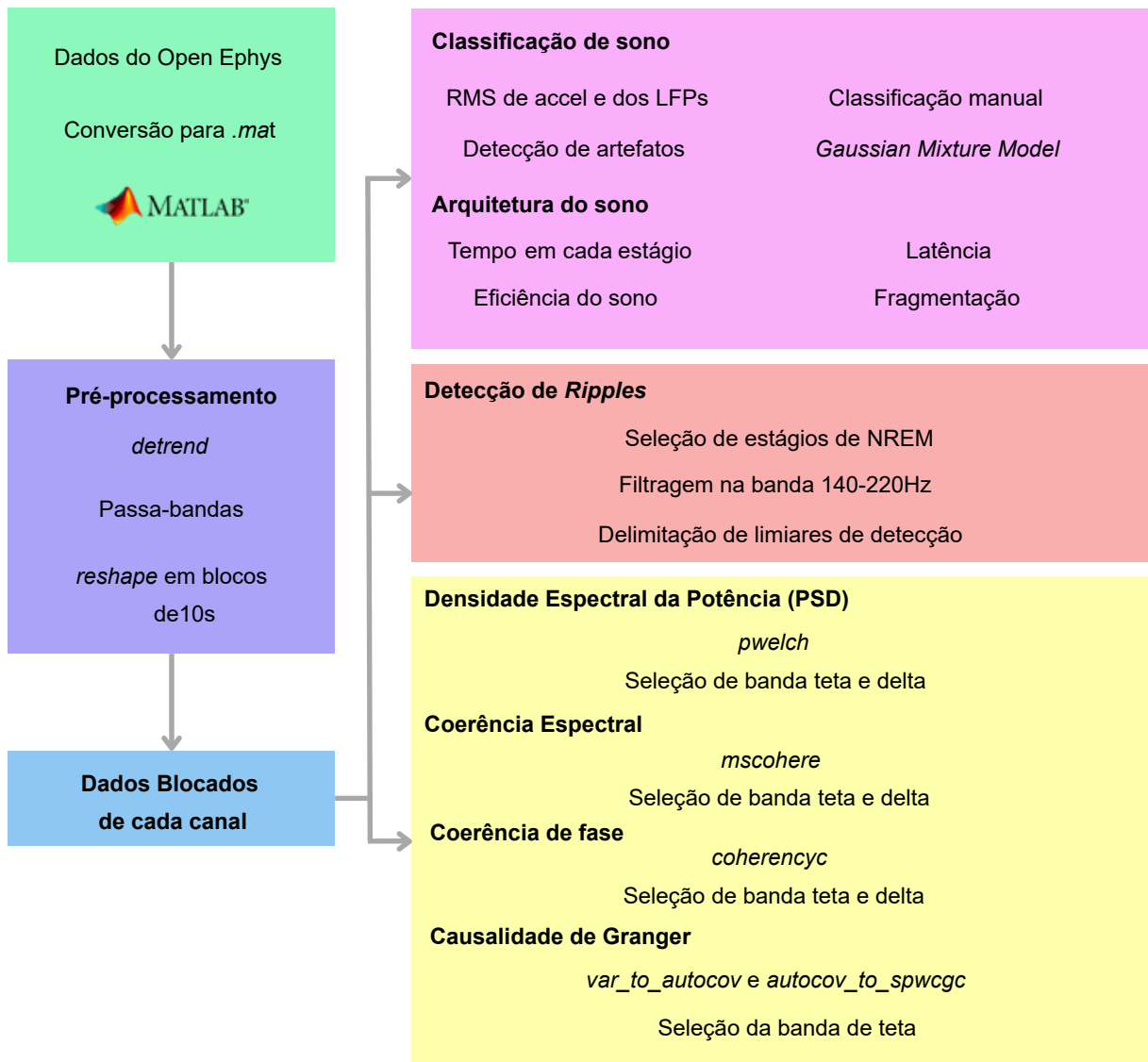
### 3.7 Análises no Matlab

Todas as análises de dados eletrofisiológicos coletados no Open Ephys foram feitas utilizando o Matlab 2022 (MathWorks®) (**Figura 4**).

#### 3.7.1 Conversão de dados

Inicialmente os dados foram convertidos de continuous (extensão do Open Ephys) para .mat (extensão do Matlab). Para isso, utilizou-se a função `load_open_ephys_data` (disponível em

<https://github.com/open-ephys>). Logo em seguida, os dados foram reamostrados de 30Khz para 1KHz, usando a função nativa do Matlab denominada `decimate`.



**Figura 4:** Figura esquematizando as análises feitas no Matlab e as principais etapas para cada uma delas.

### 3.7.2 Classificação de sono

A classificação de sono foi realizada utilizando uma toolbox de código aberto desenvolvida por nosso grupo para análise inicial de arquitetura do sono de roedores (Mendes, 2021, disponível em <https://github.com/ikaro-beraldo/sleep-stages-classification>). A toolbox realiza desde o pré-processamento até a classificação final do estado comportamental em REM, NREM e acordado.

## **Pré-processamento**

Antes de serem classificados, os registros de LFP e acelerômetro passaram por uma série de etapas:

- 1 - Remoção de tendências constantes (função detrend);
- 2 - Filtragem de passa-banda (LFPs - 0.7-250 Hz; acelerômetro - 80-300 Hz);
- 3 - Para a classificação dos estados do ciclo sono vigília: filtro butterworth de 2° ordem (funções butter e filtfilt);
- 4 - Filtragem para demais análises: two-way least-squares FIR filtering de 3426° ordem (função eegfilt);
- 5 - Separação em épocas de 10 segundos (função reshape).

## **Cálculo de densidade espectral de potência, RMS, acelerômetro e integração de potência de banda**

Cada época de 10 segundos do LFP de CA1 teve sua densidade espectral extraída utilizando a função pwelch (Hayes, 1996) (window length: 125 samples; window overlap: 0 samples; NFFT: 2500). A potência de cada componente de frequência foi normalizada pela soma da potência de todos os componentes de frequência do sinal, exceto a faixa 58-62 Hz (faixa de ruído da rede elétrica). A potência das bandas Delta (1-4 Hz), Teta (5-12 Hz) e a razão Teta/Delta (T/D) foi calculada para cada uma das épocas.

Posteriormente, os vetores dos três eixos do acelerômetro (x, y e z) passaram por um processo de ortogonalização, resultando em um único vetor de acelerômetro, que teve a raiz do seu valor quadrático médio (RMS) computado.

Por fim, os valores da razão T/D e do RMS do acelerômetro foram normalizados de acordo com a distribuição z-score

## **Detecção de artefatos**

Os registros de LFP de CA1 e do acelerômetro passaram por uma etapa de exclusão de artefatos. Caso uma época de 10 segundos atingisse um dos seus valores acima de 7 desvios padrão da potência daquela época, ela era considerada artefato, não sendo considerada em análises posteriores.

## **Gaussian Mixture Model – GMM e inspeção visual**

O Modelo de Mistura de Gaussianas (do inglês, Gaussian Mixture Model – GMM) descreve a densidade de probabilidades de observações em relação a uma população (Reynolds, 2009). Portanto, ele assume que as amostras estão distribuídas em um número de gaussianas pré-definidas. Para a classificação de sono, foi utilizado a função `fitgmdist` do MATLAB para ajustar os parâmetros de entrada (1) razão T/D e (2) RMS do acelerômetro à 3 funções gaussianas (uma para cada estado do ciclo sono-vigília).

Inicialmente, a função `fitgmdist` utiliza o k-means para ajustar os dados às funções gaussianas. Então, para calcular a probabilidade posterior da amostra de 10 segundos em relação às 3 gaussianas, o algoritmo considera a posição dessa amostra na distribuição. Uma classificação manual de 20 épocas para cada estado é utilizada para definir os valores iniciais de média e covariância de cada uma das distribuições gaussianas. Após a classificação manual, é feito um cálculo da taxa de falsos positivos (FPR) e de verdadeiros positivos (TRP) para cada valor de probabilidade posterior de cada estado do ciclo sono-vigília. Para cada estado, o algoritmo seleciona o limiar com menor distância euclidiana ao ponto (0,1) entre a FPR e a TPR (Pepe, 2003), que serviu de referência para a classificação de todas as épocas. Dessa forma, épocas com valor de probabilidade posterior acima do limiar do estado em questão era classificada como parte desse estado. Em suma, o grupo cujas épocas possuíam alta razão T/D e baixo valor de RMS do acelerômetro foi classificado como sono REM. Já o grupo cujas épocas possuíam moderada a baixa razão T/D e alto valor de RMS do acelerômetro foi classificado como estado de vigília (AWAKE). Por fim, o terceiro grupo, cujas épocas possuíam baixa razão T/D e baixo valor de RMS do acelerômetro, foi classificado como sono não-REM (NREM).

### **3.7.3 Arquitetura do sono**

Para avaliar a arquitetura do sono, são analisados aspectos como a eficiência do sono, o tempo despendido em cada estágio de sono e a fragmentação. Esse cálculo é feito para cada dia de registro, portanto havendo uma arquitetura para BL e outra para PL.

A eficiência é dada pelo tempo total que o animal gastou dormindo no período de registro, sendo calculado pela soma dos tempos no estado REM e NREM dividido pelo tempo total nos 3 estados. O tempo despendido em cada estágio é dado em percentagem pela razão do número total de épocas em cada estágio pelo número total de épocas classificadas (as épocas não classificadas

foram desconsideradas).

Para avaliar a fragmentação, observa-se a incidência de cada estágio do ciclo sono-vigília por minuto (número de bouts por minuto). Para isso, foi utilizado o critério mínimo de 2 épocas de 10 segundos sucessivas (bout), sendo então o tempo mínimo de um bout 20 segundos. A incidência de cada fase é expressa pela razão do número de bouts pelo tempo total (em minutos) de épocas classificadas.

Já a duração dos bouts leva em consideração o mesmo critério de definição de bouts e é definida pelo comprimento absoluto (em segundos) de cada bout de cada fase.

#### 3.7.4 Latência para o sono

Para cada um dos dias de registro foi calculada a latência para o sono, ou seja, o período de tempo entre o início do registro do dia e o início do sono. O marco de início do sono foi definido como o momento em que em uma janela de 5 minutos, 80% das épocas foram classificadas como sono NREM. Já a latência para sono REM foi definida como o período de tempo entre o marco de início do sono e o primeiro episódio (época de 10 segundos) de sono REM.

#### 3.7.5 Detecção de *ripples*

Como descrito brevemente na introdução, as *ripples* são oscilações rápidas (120-250 Hz) que ocorrem no hipocampo principalmente no sono NREM e em períodos de vigília de baixa atividade (Klinzing *et al.*, 2019). Esse evento oscilatório é gerado em células piramidais de CA1 excitadas pelo colateral de Schaffer vindo de CA3 durante eventos de sharp-wave (oscilação gerada pelo disparo síncrono das células piramidais de CA3) (Buzsáki *et al.*, 1992). Dessa forma, a amplitude da *ripple* pode ser uma forma de identificar o posicionamento do eletrodo, uma vez que quanto maior sua amplitude, mais próximo da camada piramidal de CA1 o eletrodo está.

Para detectá-las, os registros de LFP de CA1 divididos em blocos de 10 segundo foram filtrados na faixa de 140-220 Hz. A detecção foi feita apenas nas épocas de sono NREM, quando há maior prevalência desse evento. As amostras de cada uma das épocas foram elevadas pela potência de 2 a fim de manter todos os valores positivos, e o sinal foi normalizado utilizando-se o z-score (Taxidis *et al.*, 2015).

Foram selecionados como eventos efetivos apenas aqueles que ultrapassaram o limiar de 3 desvios padrões da média do sinal filtrado. O início do evento foi definido como o índice anterior ao pico cujo valor ultrapassasse o limiar de 1 desvio padrão e o final do evento foi definido como

o índice posterior ao pico cujo valor também cruzasse o limiar de 1 desvio padrão. Ademais, apenas eventos com duração mínima de 50 ms e duração máxima de 450 ms foram aceitos. (Taxidis *et al.*, 2015).

Considerando-se que nossa região de interesse neste projeto é a camada piramidal de CA1, após a detecção, selecionamos o canal com maior amplitude da *ripple* filtrada para fazer as demais análises.

### 3.7.6 Densidade espectral de potência (PSD)

A PSD é uma forma de medir a potência de determinadas frequências em um sinal elétrico utilizando-se a transformada de Fourier (Buzsáki e Draguhn, 2004; Gao, 2015). Ela é usada como parâmetro para compreender quais frequências predominam e como suas potências fluem nas diferentes regiões cerebrais durante diferentes estágios do ciclo sono-vigília. Para cada dia, calculamos os valores de PSD dos LFPs de CA1 e mPFC para cada época.

Para isso, foi utilizado a função *pwelch*. Ademais, os valores obtidos foram separados e integrados para as bandas delta (1-4 Hz) e teta (5-12 Hz). Depois, fizemos a média da potência das diferentes bandas nas épocas de sono REM e NREM para BL e PL.

### 3.7.7 Coerência espectral

A coerência espectral é uma forma de medir a sincronia entre diferentes sinais com base, principalmente, em suas amplitudes dentro de determinadas faixas de frequências (Siegel *et al.*, 2012). Essa sincronia pode ocorrer entre diferentes faixas de frequências, conhecido como modulação, ou entre a mesma faixa de frequência de regiões cerebrais distintas (**Figura 5B**). Para os fins desse projeto, foram calculadas as coerências espectrais de mPFC e CA1 tendo como base a mesma faixa de frequência.

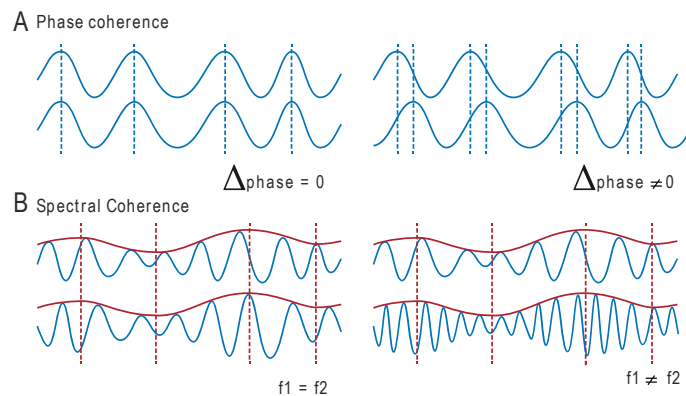
Para realizar o cálculo, é levado em consideração o conjunto de dados eletrofisiológicos de CA1 e mPFC. Utilizamos a função *mscohere*, com NFFT de 2 elevado à 12.

Após o cálculo de coerência, o dado foi separado em diferentes bandas de frequência para diferentes estágios do sono. Separamos as bandas delta (1-4Hz) e teta (5-12Hz). Então foi feito a média dos valores de coerência da banda Teta durante REM e delta durante NREM.

### 3.7.8 Coerência de fase

A coerência de fase é uma forma de medir a sincronização entre diferentes regiões cerebrais com base na fase do sinal em diferentes faixas de frequências (Siegel *et al.*, 2012). O alinhamento de fase de sinais oscilatórios de diferentes regiões cerebrais parece regular a conectividade entre essas regiões (Siegel *et al.*, 2012). A coerência de fase ocorre entre duas faixas iguais de frequências, e ela é caracterizada pela diferença consistente entre as fases de duas regiões, seja ela igual ou não a 0 (**Figura 5A**).

Para realizar o cálculo de coerência, é levado em consideração o conjunto de dados eletrofisiológicos de CA1 e mPFC. Para isso, utiliza-se a função *coherencyc* do pacote Chronux Matlab 2.12 v03 para cada época de 10 segundos. Os parâmetros utilizados foram: taxa de amostragem: 1000 Hz; banda de frequência: 0-50 Hz; Tapers: [3 5]; cálculo do erro: [2 0.05]; média entre ensaios (trials): 1 (verdadeiro); fator de preenchimento do fft: 0; comprimento de segmentos: 2. O cálculo também foi feito levando-se em consideração a separação de cada dia.



Adapted from Siegel, M., et al 2012

**Figura 5:** Figura ilustrando os diferentes tipos de coerências. **(A):** Coerência de fase, podendo a diferença de fase ser igual ou diferente de 0. **(B):** Coerência espectral: sendo possível comparar a dinâmica entre frequências iguais ou diferentes. Figura adaptada de Siegel *et al.* (2012).

### 3.7.9 Causalidade de Granger

A causalidade de Granger é um método analítico utilizado para inferir a direcionalidade do fluxo de determinada informação entre regiões do cérebro, por exemplo. Portanto após verificação da correlação entre a coerência de fase e o DI, testamos se a sincronia em teta entre hipocampo e mPFC possuía alguma direcionalidade específica. Este cálculo se distingue dos de coerência por avaliar não apenas a correlação entre sinais, mas também a relação de causa e efeito. Isso

é feito determinando o sentido casual entre duas variáveis, estipulando o quanto o passado de uma série temporal prevê o futuro da outra (Bressler e Seth, 2011).

Para este tipo de análise, utiliza-se modelos vetoriais autorregressivos (VAR). No Matlab, é levado em consideração o conjunto de dados eletrofisiológicos de CA1 e mPFC e são utilizadas funções da toolbox de “spectral multivariate Granger causalities”. As principais funções utilizadas foram a `tsdata_to_var` e a `autocov_to_spwgc`. Em seguida, a estatística foi feita considerando-se os valores máximos da causalidade na faixa de teta para cada animal.

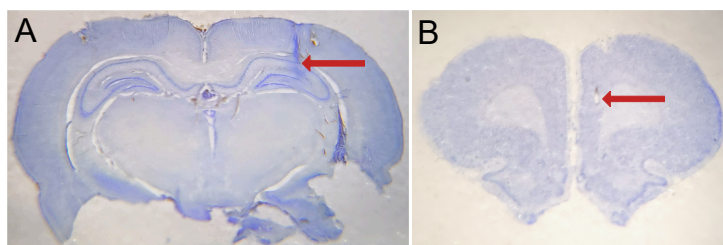


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Histologias

As análises histológicas preliminares confirmaram o posicionamento dos eletrodos, contudo ainda é preciso finalizar os cortes no criostato para assegurar a consistência desse posicionamento em todos os animais avaliados.

Em particular, no que concerne a região de CA1, é observável que o estereotrodo de 2 canais foi adequadamente situado nessa área, permitindo a captação da atividade na camada piramidal (**Figura 6A**). O bom posicionamento do eletrodo no mPFC também pode ser visualizado na **Figura 6B**.



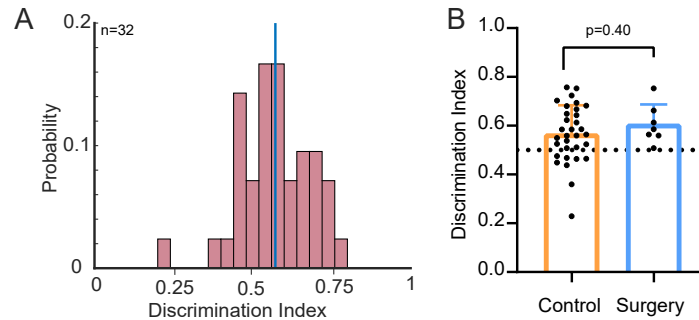
**Figura 6:** (A): Fatia do hipocampo corada em cresil violeta. Observa-se a trajetória do eletrodo e na ponta da seta a região de CA1. (B): Fatia do mPFC corada em cresil violeta. Na ponta da seta observa-se ponto com lesão eletrolítica.

### 4.2 Calculo do índice de discriminação para o TLO

Inicialmente, procedemos à avaliação da performance dos animais no TLO. O cálculo do DI foi conduzido com base na razão entre o tempo de exploração do objeto deslocado e o tempo total de exploração ao longo do dia de evocação, conforme delineado nos métodos descritos anteriormente.

Os sete animais submetidos ao implante de eletrodos apresentaram, em média, um DI de 0,6 e um desvio padrão de 0,08 (**Figura 7B**). O menor DI foi de 0,51 enquanto o maior foi de 0,75, demonstrando uma variação no desempenho dos animais. Ao comparar os sete animais que passaram pelo implante de eletrodos com animais controle de outros projetos do nosso laboratório que passaram pelo mesmo protocolo ( $n = 32$ ), confirmamos que o desempenho de animais que passaram pela cirurgia foi semelhante aos que não passaram (teste t não-pareado, two-tailed,  $p = 0,4$ ,  $t=0,8553$ ,  $df=37$ ) (**Figura 7A e B**). Observou-se, igualmente, uma considerável variabilidade no desempenho geral dos 32 animais (média = 0,57,  $sd = 0,12$ ), como é esperado para esse tipo de tarefa (Jablonski *et al.*, 2013; Becegato e Silva, 2022; Ennaceur e

Delacour, 1988) (**Figura 7A**). Com isso em vista, nos perguntamos sobre a possível correlação entre o padrão de sono dos animais e o desempenho observado, hipotetizando que o sono poderia, em parte, explicar as disparidades presentes nos DIs.



**Figura 7: (A):** Histograma demonstrando a variabilidade do TLO, com os IDs de 32 animais, com média de 57. **(B):** Comparação entre os animais que não passaram por cirurgia de implante de eletrodo (control; n=32) e os que passaram (surgery; n=7). Não houve diferença significativa entre o desempenho dos dois grupos (teste-t não pareado, two-tailed,  $p=0,4$ ,  $t=0,8553$ ,  $df=37$ ).

### 4.3 Caracterização eletrofisiológica do ciclo sono-vigília

Para avaliar os diferentes parâmetros do ciclo sono-vigília separamos o registro eletrofisiológico em estado acordado, REM e NREM. Para isso, utilizamos uma toolbox de classificação de sono desenvolvido pelo nosso grupo após pré-processamento dos dados dos LFPs (Mendes, 2021). Nessa toolbox utilizamos o RMS do acelerômetro e a razão T/D do LFP hipocampal normalizados por z-score para a diferenciação entre estados, como descrito nos métodos (**Figura 8A e B**). Como utilizamos um estereotrodo de 2 canais no hipocampo, padronizamos o uso do eletrodo mais profundo (eletrodo 2), para a classificação do sono, uma vez que era o eletrodo mais próximo do giro, e portanto com maior sinal de teta para a classificação. Janelas com razão T/D mais elevados e RMS do acelerômetro baixo foram classificadas como pertencentes ao sono REM, uma vez que nesse período há uma alta potência de teta, e redução do movimento animal (**Figura 8B e E**). Já as janelas com valores de acelerômetro e de T/D mais baixos são classificadas como NREM, quando há maior sincronização da atividade oscilatória e prevalência de frequências mais lentas no LFP (**Figura 8B e D**). Por fim, épocas com atividade mais alta do acelerômetro foram classificadas como estado acordado (**Figura 8B e F**).

Quando observamos a variação das potências de teta e delta ao longo do tempo para cada animal (**Figura 9**), percebemos que, de fato, épocas classificadas como REM (em cinza) possuem maior potência de teta, enquanto que épocas classificadas como NREM (em azul) possuem

maior potência de delta. Isso fica mais claro na figura 8C, na qual podemos observar o exemplo de um animal alternando entre REM e NREM. No espectrograma, tem-se a variação das potências das frequências ao longo do tempo, enquanto que no hipnograma logo abaixo observamos os respectivos estados do ciclo sono e vigília.

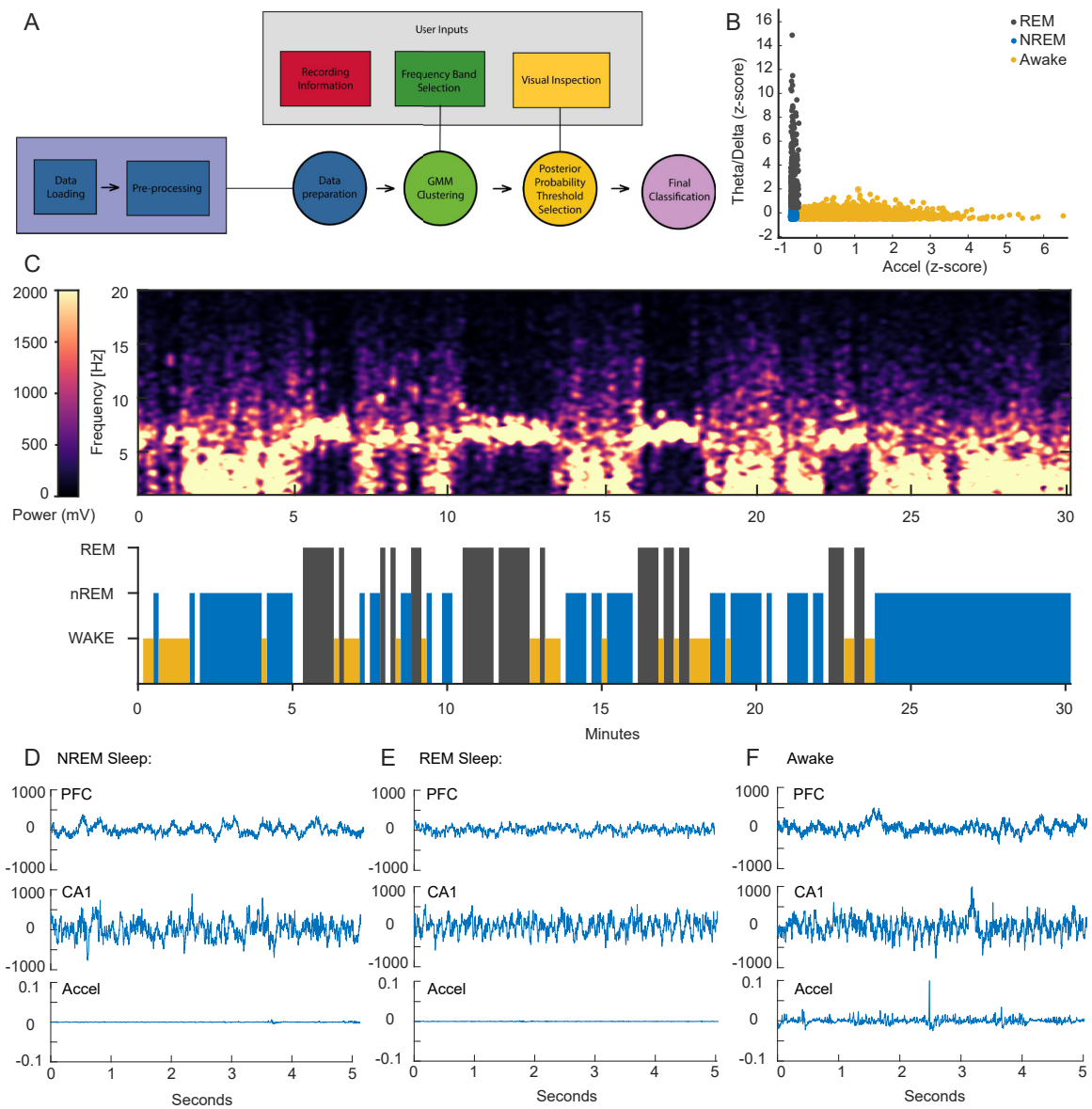
Com base nesses dados, foi possível comparar dados da arquitetura do sono antes e depois do aprendizado no TLO.

#### 4.4 Arquitetura do sono

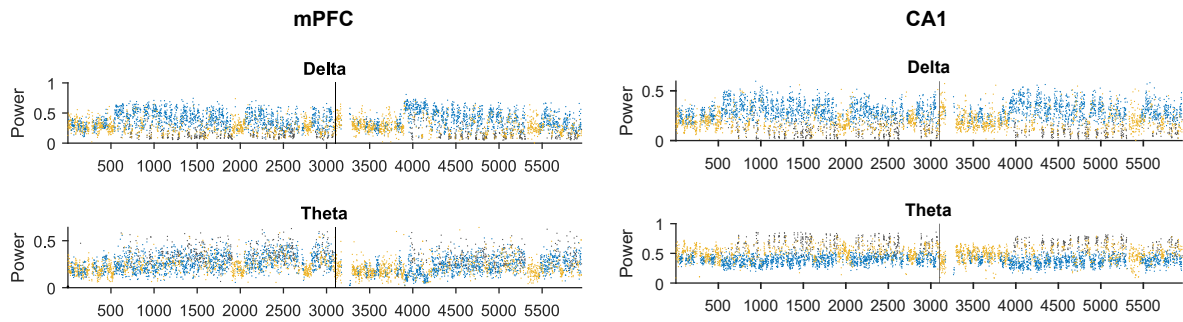
Os principais dados de arquitetura que avaliamos foi o tempo despendido em cada estado de sono, o número de episódios ininterruptos de sono (bouts), a duração de cada bout, bem como a eficiência do sono e as latências, conforme detalhado nos métodos.

De forma geral, não constatamos diferenças significativas no tempo dedicado ao sono antes e após o processo de aprendizado (teste t pareado, one-tailed; tempo em REM (BL vs. PL):  $p=0,25$ , tempo em NREM (BL vs. PL):  $p=0,23$ , tempo acordado (BL vs. PL):  $p=0,23$ ) (**Figura 10 A**). Quando olhamos para a eficiência do sono, definida como a porcentagem do tempo total dedicado ao sono, também não ha diferenças entre BL e PL (teste t pareado, one-tailed,  $p=0,21$ ) (**Figura 10D**). Em relação ao número de bouts por minuto, observamos uma redução do número de bouts de NREM em cerca de 3% (teste t pareado, one-tailed, bouts por minuto NREM (BL vs. PL):  $p=0,04$ ,  $t=2,098$ ,  $df=6$ ), sugerindo uma menor fragmentação desse estágio de sono em PL. Nos outros estágios, não houve alteração no número de bouts (teste t pareado, one-tailed; bouts por minuto REM (BL vs. PL):  $p=0,24$ , bouts por minuto acordado (BL vs. PL):  $p=0,14$ ). Quanto à duração de bouts, não houve diferença entre BL e PL para nenhum dos estados (teste t pareado, one-tailed; duração dos bouts REM (BL vs. PL):  $p=0,09$ , duração dos bouts NREM (BL vs. PL):  $p=0,22$ , duração dos bouts acordado (BL vs. PL):  $p=0,18$ ) (**Figura 10 C**).

Notavelmente, em relação ao tempo despendido em REM (**Figura 10A**) e no tempo total de sono (**Figura 10D**), esperava-se encontrar algum aumento de tempo despendido pós-aprendizagem, conforme documentado na literatura sobre aumento do tempo de sono em roedores após exposição a tarefas de aprendizado (Milinsky *et al.* 2021; Vyazovskiy e Tobler, 2012), especialmente em relação aos períodos de REM (Pagel *et al.*, 1973; Smith, 1996; Datta, 2000; Milinski *et al.*, 2021). No entanto, observamos uma diminuição significativa da latência para o primeiro sono REM pós-aprendizagem de 55% (teste t pareado, one-tailed,  $p=0,037$ ,  $t=2,149$ ,  $df=6$ ), consistente com achados prévios na literatura (Datta, 2000) (**Figura 10E**).



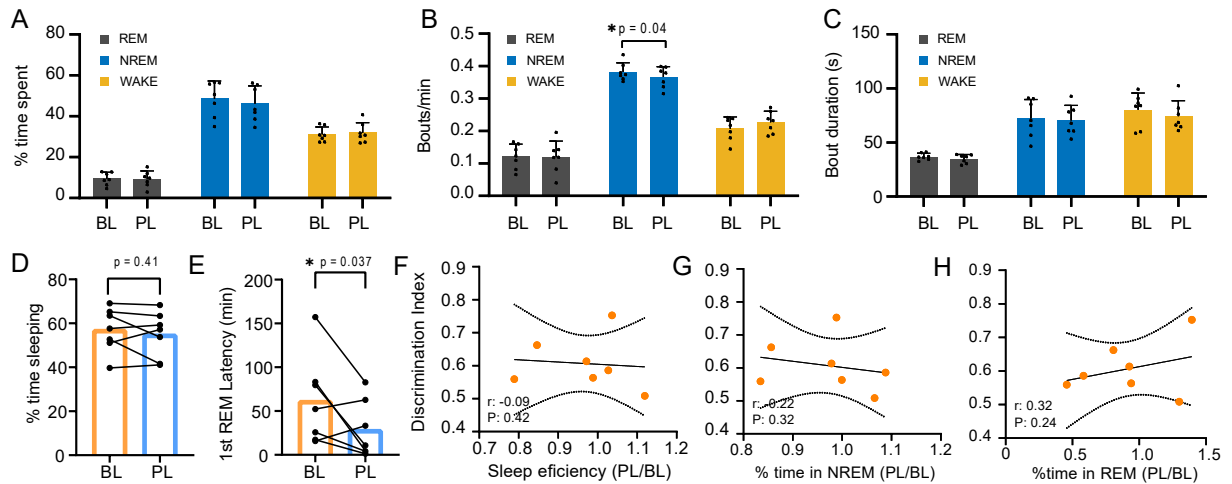
**Figura 8:** (A): Esquema explicativo do funcionamento da toolbox de classificação de sono. (B): Exemplo de classificação, onde o eixo X representa o RMS do acelerômetro em z-score e o eixo Y a relação T/D do LFP de CA1. As épocas em amarelo representam blocos de 10 segundos classificados como acordado, épocas em cinza são aqueles classificados como REM e em azul os classificados como NREM. (C): Época representativa de um período de 30 minutos de sono. No painel de cima há um espectrograma, onde o eixo X é o tempo, o eixo Y são as frequências e a escala de cores representa a potência do sinal. No painel de baixo, há um hipnograma da mesma época, no qual cada barra representa uma classificação de sono: amarelo para acordado, cinza para REM e azul para NREM. Percebe-se que em épocas de REM do hipnograma, há maior potência da frequência de teta no espectrograma. (D): LFPs representativos do dado bruto do sono NREM. (E): LFPs representativos do dado bruto do sono REM. (F): LFPs representativos do dado bruto do estado acordado. Para D, E e F: o painel de cima é um LFP do PFC, o central de CA1 e a o inferior a do acelerômetro. Nestes gráficos, o eixo Y é a potência em mV e o eixo X o tempo em segundos.



**Figura 9:** Figura representativa de um animal. Em todos os gráficos o eixo X representa o número do bloco de 10 segundos e as cores representam sua classificação, sendo amarelo para o estado acordado, cinza para REM e azul para NREM. O traçado em preto é a divisão entre BL e PL. No eixo Y, tem-se a potência do sinal de teta ou de delta, conforme intitulado acima do gráfico. Ademais, as colunas contêm gráficos de mPFC (à esquerda) e do eletrodo mais profundo de CA1, utilizado para a classificação (à direita). Observa-se que épocas classificadas como NREM possuem maior potência de delta, principalmente no mPFC, enquanto que épocas classificadas como REM possuem maior potência de teta, principalmente em CA1.

Ademais, observamos uma variação na arquitetura do sono entre os animais, exemplificada pelo tempo dedicado ao sono REM, com desvio padrão (SD) de 3,324 no BL e 4,396 no PL. Para o tempo dedicado ao sono NREM, os SDs foram de 8,20 (BL) e 8,98 (PL). Diante dessa variabilidade, avaliamos se essa disparidade no tempo despendido nos diferentes estágios de sono poderia potencialmente explicar a variação no desempenho dos animais no TLO. Para isso, realizamos uma correlação de Pearson (**Figura 10 F, G e H**). Não observamos nenhuma correlação entre os IDs e o tempo despendido em REM (correlação de Pearson,  $r=0,32$ ,  $p=0,24$ ), o tempo despendido em nREM (correlação de Pearson,  $r=0,22$ ,  $p=0,32$ ) e o tempo de sono total (correlação de Pearson,  $r=-0,09$ ,  $p=0,42$ ).

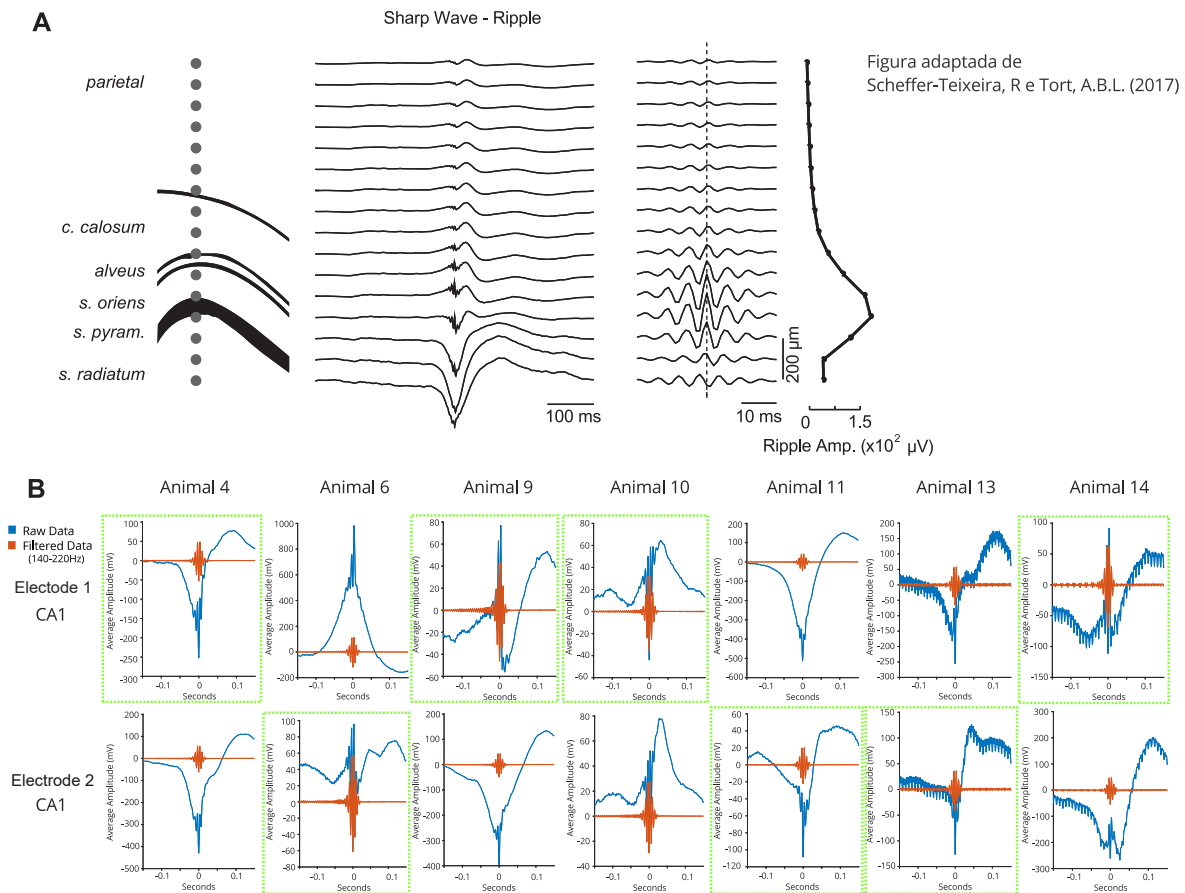
Diante desse cenário, nos perguntamos se a variação no desempenho dos animais poderia não derivar da arquitetura do sono per se, mas sim de eventos oscilatórios que ocorrem durante o sono, especialmente durante o sono REM.



**Figura 10:** (A): Porcentagem de tempo média despendido em cada estado do ciclo sono-vigília, sendo as barras cinzas, REM, as azuis, NREM e as amarelas, acordado, em BL e PL. (B): Número de bouts por minuto em cada estado do ciclo do sono. (C): O tempo de duração de cada bout em segundos para cada estado do ciclo do sono. (D): Porcentagem média do tempo despendido dormindo para BL e PL. (E): Latência para o 1o REM em minutos para BL e PL. Observa-se uma redução significativa da latência para o PL. (F): Correlação entre o desempenho de cada animal e o tempo despendido dormindo (normalizado por BL). (G): Correlação entre o desempenho de cada animal e o tempo despendido em NREM (normalizado por BL). (H): Correlação entre o desempenho de cada animal e tempo despendido em REM (normalizado por BL).

#### 4.5 Separação dos canais inseridos em CA1 utilizando ripples

Para a avaliação dos distintos parâmetros eletrofisiológicos do sono, utilizamos os eletrodos de CA1 posicionados na camada piramidal, ou em proximidade imediata a esta, para as análises. Para tal seleção, optamos pelos canais que apresentavam a amplitude mais elevada do sinal filtrado de ripples do sono NREM (Figura 11A). Conforme previamente mencionado, as ripples são eventos desencadeados na camada piramidal de CA1, tornando a amplitude filtrada um indicador relevante para identificar quais eletrodos estão mais próximos dessa camada (Scheffer-Teixeira e Tort, 2017). Destacado de verde nas figuras estão os canais escolhidos para cada animal, sendo que para todas as figuras está representado a ripple média. (Figura 11B).

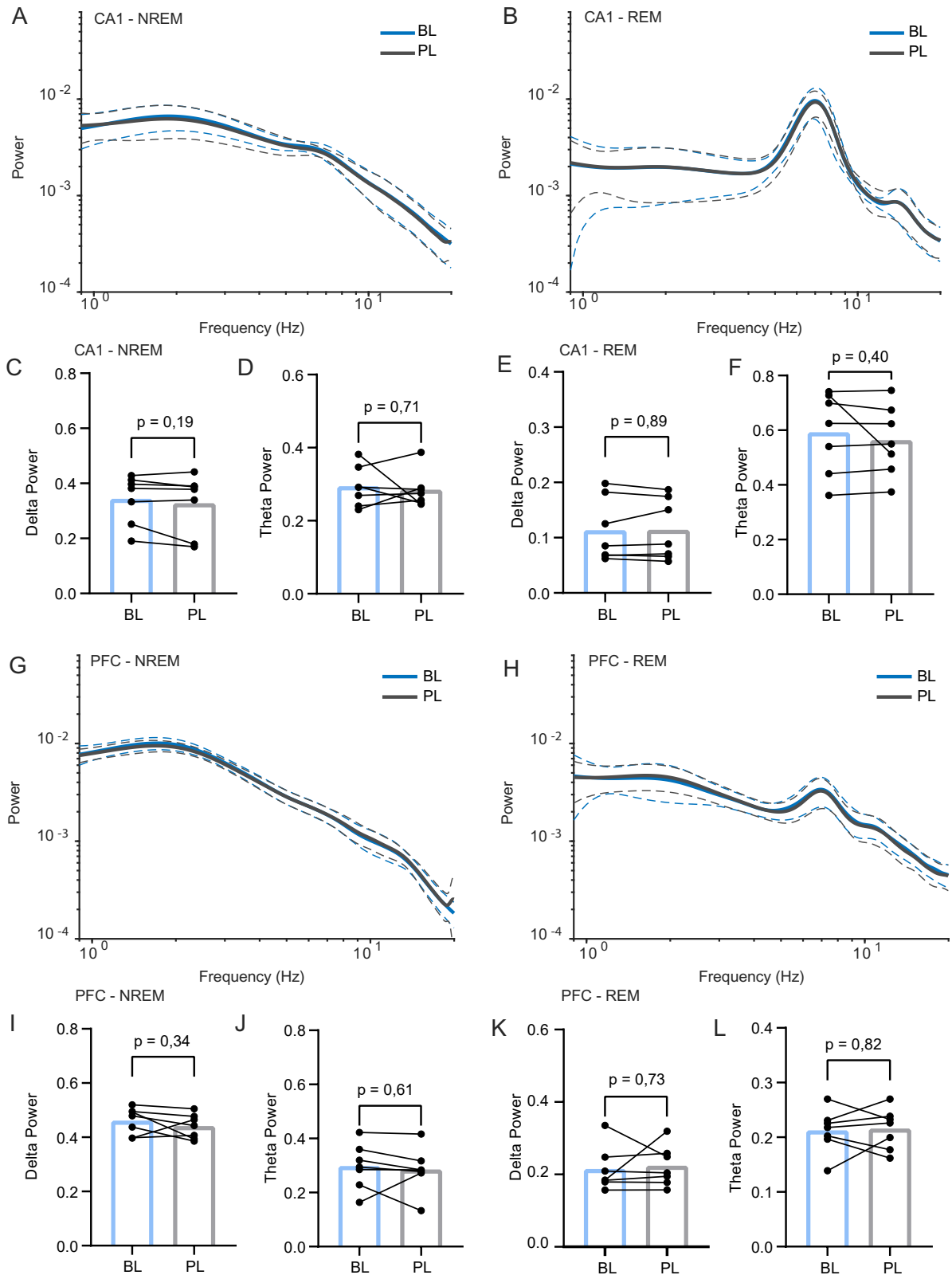


**Figura 11: (A):** Perfil das ripples nas diferentes camadas de CA1, registradas utilizando um probe linear. Repara-se que na camada piramidal a ripple possui sua maior amplitude. Figura adaptada de Scheffer-Teixeira e Tort (2017). **(B):** Ripple média de cada eletrodo de CA1 (electrode 1 e electrode 2) para cada animal. Em azul, está a ripple bruta, e em vermelho a ripple filtrada (140-220Hz). Circulado em verde está o canal que foi selecionado para cada animal para as próximas análises: eletrodo 1 para os animais 4, 9, 10 e 14 e eletrodo 2 para os animais 6, 11 e 13.

#### 4.6 Densidade espectral da potência (PSD) antes e depois do aprendizado

Conforme descrito anteriormente, a PSD é empregada como parâmetro para avaliar a distribuição de potência em diversas frequências do LFP de certa região em determinado momento. Neste projeto, examinamos as PSDs do mPFC e CA1 durante o sono REM e NREM (**Figura 12A, B, G e H**). Ao compararmos essas PSDs antes e depois do aprendizado no TLO, não observamos diferenças entre BL e PL tanto nas potências de delta e teta durante sono NREM (teste t pareado, one-tailed, delta mPFC:  $p=0,34$ , teta mPFC:  $p=0,61$ , delta CA1:  $p=0,19$ , teta CA1:  $p=0,71$ ) (**Figura 12C, D, I e J**) e quanto nas potências de delta e teta durante sono REM (teste t pareado, one-tailed, delta mPFC:  $p=0,73$ , teta mPFC:  $p=0,82$ , delta CA1:  $p=0,89$ , teta CA1:  $p=0,40$ ) (**Figura 12E, F, K e L**). Dessa forma, nos perguntamos se nesse tipo de tarefa, a in-

teração entre as regiões mPFC e CA1 seria mais relevante do que a dinâmica em cada região isoladamente. Assim, procedemos à avaliação das coerências espectrais e de fase nas mesmas faixas de frequência entre as regiões.





**Figura 12: Densidade Espectral da Potência (PSDs).** (A): PSDs médias de CA1 durante NREM (n=7), em azul o BL e em cinza o PL. No eixo X estão as frequências de 0 a 10 em escala de log e no eixo Y estão as potências, também em escala de log. (B): PSDs médias de CA1 durante REM (n=7). Os eixos e cores seguem o mesmo padrão descrito para A. (C): Potência média de delta em CA1 durante sono NREM em BL e PL. (D): Potência média de teta em CA1 durante sono NREM em BL e PL. (E): Potência média de delta em CA1 durante sono REM em BL e PL. (F): Potência média de teta em CA1 durante sono REM em BL e PL. (G): PSDs médias de mPFC durante NREM (n=7). Os eixos e cores seguem o mesmo padrão descrito para A. (H): PSDs médias de mPFC durante REM (n=7). Os eixos e cores seguem o mesmo padrão descrito para A. (I): Potência média de delta em mPFC durante sono NREM em BL e PL. (J): Potência média de teta em mPFC durante sono NREM em BL e PL. (K): Potência média de delta em mPFC durante sono REM em BL e PL. (L): Potência média de teta em mPFC durante sono REM em BL e PL.

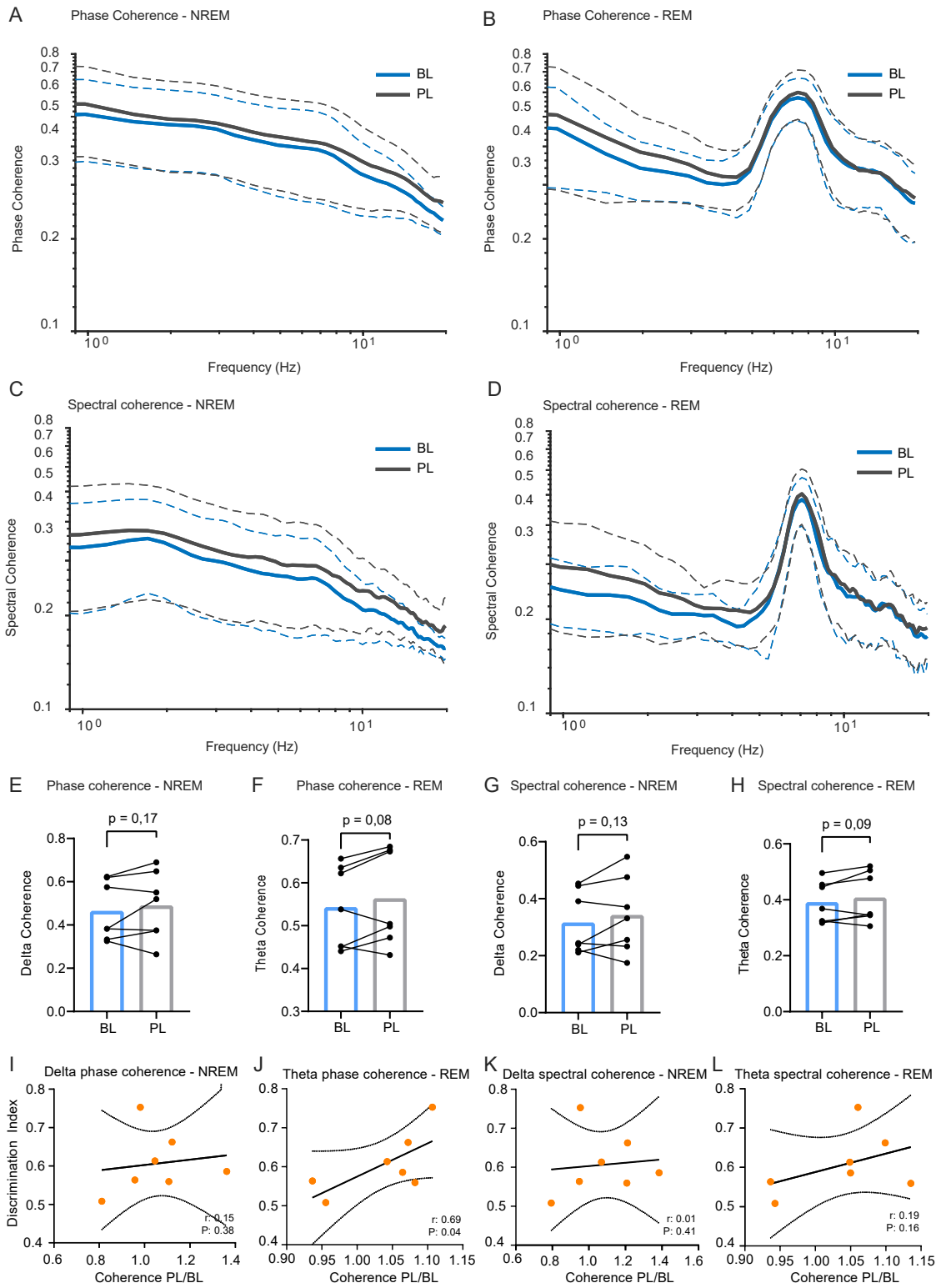
#### 4.7 Coerência de fase e espectral antes e depois do aprendizado.

Como descrito anteriormente, a coerência de fase representa uma métrica para avaliar a sincronização entre diferentes regiões cerebrais com base na fase das frequências, enquanto a coerência espectral mensura a modulação entre regiões cerebrais com base na potência do sinal nas diferentes frequências. Aqui, investigamos as coerências entre mPFC e CA1 durante o sono REM e NREM (**Figura 13 A a D**).

Ao compararmos as coerências antes e depois do aprendizado no TLO, antecipávamos um aumento em PL, considerando que trabalhos anteriores relataram esse aumento, principalmente para coerência espectral na faixa de teta durante o sono REM (Lobato *et al.*, 2023). Contudo, não encontramos diferença significativa entre BL e PL nas coerências na faixa de teta durante REM (teste-t pareado, one tailed, coerência de fase em teta:  $p=0,08$  coerência espectral em teta:  $p=0,09$ ), nem na faixa de delta durante NREM (teste-t pareado, one tailed, coerência de fase em delta:  $p=0,17$  coerência espectral em delta:  $p=0,13$ ) (**Figura 13 E a H**).

Apesar dessa constatação, dada a variabilidade nas coerências observadas entre os animais (SD coerência de fase de delta em NREM = 0,07, SD coerência espectral de delta em NREM = 0,05, SD coerência de fase de teta em REM = 0,03, SD coerência espectral de teta em REM = 0,03) nos perguntamos se essas variações poderiam potencialmente explicar a divergência no desempenho dos animais no TLO. No que diz respeito às coerências de espectrais (**Figura 13 K e L**), não encontramos correlação significativa, seja na banda de teta durante o sono REM ou de delta durante o sono NREM (correlação de Pearson, teta em REM:  $p=0,16$  e  $r=0,19$ , delta em NREM:  $p=0,42$  e  $r=0,01$ ). No entanto, na coerência de fase, apesar de não observarmos correlação entre os DIs e a coerência de delta durante NREM (correlação de Pearson,  $p=0,38$  e

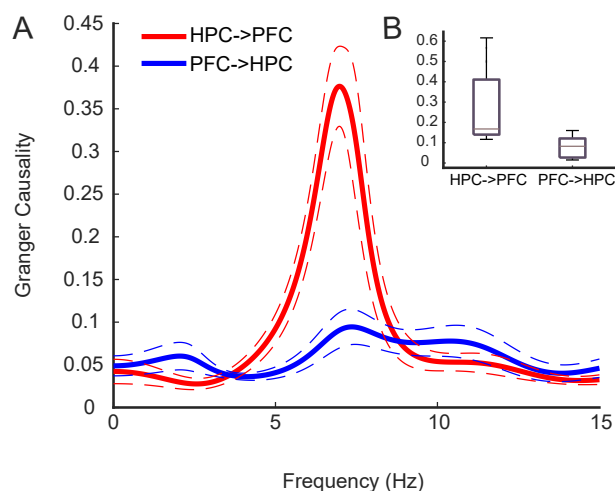
$r=0,15$ ), identificamos uma correlação significativa entre os DIs e a coerência em teta durante o sono REM (correlação de Pearson,  $p=0,04$  e  $r=0,69$ ). Isso sugere que animais que apresentaram uma maior coerência de fase em teta durante o sono REM após o aprendizado obtiveram um desempenho superior no TLO.



**Figura 13: Coerências de fase e espectral.**(A): Coerências de fase médias entre CA1 e mPFC durante NREM (n=7), em azul o BL e em cinza o PL. No eixo X estão as frequências de 0 a 10 em escala de log e no eixo Y estão as potências, também em escala de log. (B): Coerências de fase médias entre CA1 e mPFC durante REM (n=7). Os eixos e cores seguem o mesmo padrão descrito para A. (C): Coerências espectrais médias entre CA1 e mPFC durante NREM (n=7). Os eixos e cores seguem o mesmo padrão descrito para A. (D): Coerências espectrais médias entre CA1 e mPFC durante REM (n=7). Os eixos e cores seguem o mesmo padrão descrito para A. (E): Coerência de fase média para delta durante sono NREM em BL e PL. (F): Coerência de fase média para delta durante sono REM em BL e PL. (G): Coerência espectral média para delta durante sono NREM em BL e PL. (H): Coerência espectral média para delta durante sono REM em BL e PL. (I): Correlação de Pearson entre os DIs de cada animal e suas respectivas coerências de fase em delta durante NREM. (J): Correlação de Pearson entre os DIs de cada animal e suas respectivas coerências de fase em teta durante REM. (K): Correlação de Pearson entre os DIs de cada animal e suas respectivas coerências espectrais em delta durante NREM. (L): Correlação de Pearson entre os DIs de cada animal e suas respectivas coerências espectrais em teta durante REM.

#### 4.8 Causalidade de Granger.

A aplicação da causalidade de Granger permite avaliar a direcionalidade do sinal entre a região CA1 e o córtex pré-frontal medial (mPFC). Neste projeto, formulamos a hipótese de que o hipocampo modularia o sinal de teta no mPFC, prevendo, assim, uma maior causalidade de Granger no sentido hipocampo para mPFC. Ao analisarmos a causalidade máxima na faixa de teta entre as direções CA1-mPFC e mPFC-CA1 nos registros de sono REM PL, observamos que a primeira é, em média, 3,5 vezes maior que a segunda (teste-t pareado,  $p = 0,0226$ ) (**Figura 14 A e B**). Esses dados corroboram a suposição de que a modulação em teta durante o sono REM entre as duas áreas de interesse é predominantemente conduzida pelo hipocampo.



**Figura 14: (A):** Gráfico de causalidade de Granger, onde o eixo X representa as frequências e o Y o valor da causalidade. O traçado vermelho representa a causalidade média na direção CA1 para mPFC e em azul, na direção mPFC para CA1. Percebe-se que na frequência de teta a direcionalidade CA1-mPFC é maior, dado que é confirmado em B. **(B):** Boxplot da causalidade de Granger na faixa de teta, confirmando estatisticamente a significância da diferença de direcionalidade do dado em A. Dados expressos em boxplot, com traço horizontal representando a mediana e os quartis e barras verticais os outliers.

## 5 DISCUSSÃO

Atualmente, é amplamente reconhecido que padrões oscilatórios que ocorrem durante o sono têm um papel importante na corticalização de memórias (Klinzing *et al.*, 2019; Tononi e Cirelli, 2020). No entanto, os mecanismos subjacentes a esse processo ainda não são completamente compreendidos.

No caso do sono NREM, foi descrito o papel de eventos oscilatórios como ripples, delta e spindles para a reativação hipocampal e transferência de informações (Maingret *et al.*, 2016; Tononi e Cirelli, 2020; Norimoto *et al.*, 2018). No entanto, para o sono REM, as evidências para o papel de teta são relativamente escassas. Até o momento, sabe-se que a privação de REM (Juvet *et al.* 1964; Pearlman, 1969; Rasch e Born, 2013; Kim *et al.*, 2021) e perturbação de teta durante REM leva ao prejuízo na consolidação de memória (Boyce *et al.*, 2016), e o acoplamento em fase de teta hipocampal com gamma parece ter papel importante para o processamento de informações adquiridas durante vigília (Canolty e Knight, 2010). Além disso, Artigo Almeida-Filho *et al.*, 2021 mostraram mudança da direcionalidade de teta entre hipocampo e córtex retrosplenial relacionado com consolidação de memória, apontando para uma participação dessa oscilação durante REM na corticalização. Sendo assim, neste estudo investigamos possíveis associações entre arquitetura do sono e seus padrões oscilatórios (em especial durante o sono REM) com consolidação de memória.

Em nossos resultados, não observamos diferenças na arquitetura do sono antes e depois do TLO, com exceção da redução do número de bouts do sono NREM pós-aprendizagem. No entanto, notamos uma redução significativa para a latência do sono REM após aprendizado. Também não identificamos diferenças entre BL e PL em relação à potência das oscilações delta e teta em CA1 e mPFC. Contudo, ao avaliarmos a sincronia entre o mPFC e CA1 em teta, embora não tenha havido diferença entre BL e PL, observamos uma correlação positiva entre o DI e a coerência de fase em teta entre CA1 e mPFC.

### **5.1 A arquitetura de REM e a redução da latência para o sono REM pós-aprendizado**

A relação entre arquitetura do sono e aprendizado é amplamente documentada, com estudos revelando prejuízos na memória decorrentes da privação do sono REM. As primeiras evidências, embora inicialmente controversas, foram obtidas por meio do método do vaso invertido (Juvet *et al.*, 1964 e Pearlman, 1969), sendo posteriormente corroboradas por pesquisas adicionais. Experimentos conduzidos por Smith e Butler (1982), utilizando o paradigma de Two-Way Active Avoidance Test (tarefa aversiva com choque), e Smith e Rose (1985), empregando o labirinto aquático de Morris, demonstraram que a privação de sono REM resultava em desempenho inferior em tarefas de memória em ratos sprague-dawley. Ademais McDermott *et al.* (2003), enquanto estudava alterações na plasticidade sináptica de animais com privação de REM, também observaram menos freezing em animais que passaram pela tarefa aversiva de choque, confirmando que a privação de REM prejudica a consolidação de memórias.

Além disso, estudos indicam que o processo de aprendizado em si pode afetar o padrão de sono, observando-se um aumento de períodos de sono REM após testes cognitivos. Por exemplo, Lucero, já em 1970, observou o aumento de REM em roedores após aprendizado em labirinto. Hannevin *et al.* (1995) também viu esse aumento despendido em REM após exposição de ratos e gatos à tarefas com reforço positivo e negativo. No entanto, este aumento em REM parece estar associado com a aquisição do teste, uma vez que ele deixava de ser observado quando a tarefa era completamente dominada pelo animal. Ademais, o gatilho para este aumento em REM parece estar relacionado com o quão desafiador o teste era para o animal (Hannevin *et al.*, 1995). Em 2000, Datta também observou aumento do sono REM após aprendizado de ratos na tarefa de condicionamento de medo e mais recente ainda, Milinski *et al.* (2021) demonstrou que 3 horas de comportamento exploratório de camundongos gerou mais períodos de REM.

Em nossos experimentos, o aumento de REM pós-aprendizado não foi observado como

esperado, apesar de não haver estudos relatando este fenômeno após TLO. No entanto, Binder *et al.* (2012) relatam fenômeno semelhante em TLO com 2 horas de retenção, na qual a aquisição e evocação foi feita com apenas 2 horas de diferença, em vez de 24 horas como foi em nosso protocolo. Neste trabalho, o tempo em sono REM também aparentou não sofrer modificações após tarefa de objetos. Com base na literatura acima, uma possível explicação poderia ser a falta de valência emocional para o TLO, que não oferece estímulos aversivos ou recompensas claras (Ennaceur e Delacour, 1988; Ennaceur, Neave, Aggleton, 1997) como os testes usados por Hannevin *et al.* (1995) e Datta (2000). De fato, há hipóteses na literatura que sustentam que o sono REM estaria mais associado com a consolidação de memórias de aversão ou recompensa dependentes de amígdala (Genzel *et al.*, 2015; Ackerman *et al.*, 2015). Outra possibilidade para a falta do aumento de tempo despendido em REM é que o teste talvez não seja desafiador o suficiente para os animais (Hannevin *et al.*, 1995). No entanto, considerando-se que o TLO depende apenas do comportamento exploratório natural dos roedores, não é simples categorizar o quão desafiador ele é, uma vez que não é possível mensurar o desempenho do animal em erros e acertos.

Ademais, é importante pontuar que em nossos experimentos os animais não foram privados de sono em decorrência da tarefa comportamental. O sono REM está sob o controle homeostático, e a ocorrência de períodos mais longos de REM após a privação é gerado pela pressão de sono (Shea *et al.*, 2008; Datta e Oliver, 2017; Park e Weber, 2020). Em roedores, privações de duas horas ou menos já são suficientes para gerar esse efeito, e quanto mais tempo sem sono REM o animal fica, maior é o efeito rebote e o tempo despendido em REM no sono subsequente (Park e Weber, 2020). Dessa forma, é possível que as diferenças na arquitetura observadas nos experimentos citados acima tenham ocorrido devido a privação em si, como o caso de Milinski *et al.* (2021), cujo objetivo era de fato manter os animais acordados durante o período exploratório. Além disso, a falta de dados quanto ao horário de realização dos experimentos citados dificulta diferenciar o que seriam efeitos decorrentes do aprendizado ou da privação que a tarefa comportamental induz quando realizada no período em que o roedor naturalmente estaria dormindo.

Ainda, a redução de 55% na latência para REM que observamos no sono após TLO é um dado consistente com o aumento de REM pós-aprendizado observado na literatura. Datta (2000), por exemplo, encontrou uma redução de 10%, ainda que não-significativa, na latência para REM no sono pós-aprendizado de tarefa aversiva. Wetzel *et al.* (2003) avaliaram se essa

latência para o sono REM poderia estar associada ao aprendizado no labirinto em Y, no entanto não encontraram correlações. Apesar disso, a redução da latência significa que o animal entrou mais rapidamente no sono REM após a tarefa. Isso indica que o TLO, ainda que tendo apenas 30 minutos na parte inicial da manhã, quando a pressão de REM é menor, possivelmente gerou maior pressão de sono REM ao longo do dia (Park e Weber, 2020). Isso pode ser explicado tanto pelo tempo que o animal passou acordado durante a tarefa em um momento que ele possivelmente estaria em sono NREM, quanto pelo aprendizado em si. Ainda assim, é possível hipotetizar que a redução da latência é um mecanismo de controle homeostático pós-aprendizado, mas seria necessários mais experimentos para confirmação desta ideia.

## **5.2 Arquitetura de NREM e a redução do número de bouts de NREM pós-aprendizado**

O sono NREM é um componente chave na hipótese da homeostase sináptica (synaptic homeostasis hypothesis - SHY) (Tononi e Cirelli, 2015), que postula que o sono é essencial para a redução seletiva da força sináptica. Nessa hipótese, as oscilações lentas de NREM teriam um papel de redução da força sináptica das redes neurais que passam por potenciação sináptica durante o dia. Essa necessidade de renormalização das sinapses ocorre para que elas não saturam, o que prejudicaria o funcionamento neuronal normal. Ademais, a renormalização é seletiva, a fim manter sinapses relevantes e enfraquecer as menos importantes. Alguns dos mecanismos para esse controle seriam justamente as oscilações lentas, *ripples* e *spindles* que ocorrem durante NREM (Maingret *et al.*, 2016; Norimoto *et al.*, 2018).

Apesar disso, as alterações em NREM que ocorrem durante a SHY não parecem ter relação com o tempo despendido nesse estágio do sono, como acontece para REM, mas sim na amplitude das ondas lentas. Portanto, a falta de aumento no tempo despendido em NREM que obtivemos em nossos experimentos está de acordo com outros achados da literatura, que também não encontraram diferença no tempo despendido nesse estágio após o aprendizado (Lucero, 1970; Smith and Rose, 1997; Datta, 2000; Milinski *et al.*, 2021).

Além disso, a redução do número de bouts que encontramos em NREM indica uma redução da fragmentação desta fase do sono. A fragmentação do sono está associada a déficits cognitivos e piora no desempenho em tarefas de aprendizado (McCoy *et al.*, 2011; Tartar *et al.*, 2006). Portanto um sono menos fragmentado é mais efetivo para a formação de memórias, possivelmente ativando e mantendo mecanismos de homeostase sináptica de maneira mais eficiente. Entretanto, seria preciso avaliar mais a fundo outros parâmetros do sono NREM, como



as *spindles*, *ripples*, oscilações lentas, bem como a coordenação entre elas, para compreender melhor essa hipótese e confirmar se nosso modelo está de acordo com os achados da literatura.

### 5.3 Padrões oscilatórios, sono e memória.

As oscilações neurais refletem mudanças na excitabilidade do potencial de membrana, e, portanto, podem ser uma forma eficiente de transmissão de informação (Buzsáki, 2006). Ademais, a sincronização de grandes populações neurais de determinada região em diferentes frequências varia de acordo com o comportamento e função cognitiva (Buzsáki *et al.*, 2012). Dessa forma compreender a dinâmica de oscilações como delta, prevalente no sono NREM, e teta, prevalente no sono REM, é uma forma de entender quais seriam as possíveis janelas de oportunidade para a transmissão de informações e formação de memórias durante o sono.

A potência de diferentes frequências no sinal de um LFP reflete o grau de sincronização local (Buzsáki *et al.*, 2012), e conforme explicado nos métodos, utiliza-se o cálculo de PSD como forma de avaliar a distribuição de energia do sinal ao longo das frequências (Buzsáki e Draguhn, 2004; Gao, 2015). Em nossos experimentos, obtivemos os resultados esperados para as PSDs de delta durante NREM e teta durante REM, uma vez que já é bem estabelecido a prevalência de oscilações entre 5-12Hz durante REM e de 1-4Hz durante NREM (Marshall *et al.*, 2019; Klinzing *et al.*, 2019; Le Bom, 2021). No entanto, quando comparamos as potências de teta e delta em REM e NREM antes (BL) e após (PL) o aprendizado, não observamos nenhuma diferença.

Estudos sugerem que a potência de teta durante REM pós aprendizado está principalmente atrelada à formação de memórias emotivas. Por exemplo, Nishida *et al.* (2008) em estudo com humanos, observou uma correlação positiva entre a potência de teta no córtex pré-frontal durante REM e a formação de memórias aversivas. O mesmo efeito não foi observado para memórias neutras (Nishida *et al.*, 2008). Sopp *et al.* (2017) também em experimentos em humanos, observou o mesmo fenômeno entre potência de teta no PFC durante REM e consolidação de memórias aversivas. Já em experimentos com ratos na tarefa de Two-Way Active Avoidance Test, foi observado o aumento da potência de teta no EEG da região do hipocampo durante REM, seguido do aumento de spindles durante NREM (Fogel *et al.*, 2009), também sugerindo um papel de teta na formação de memórias aversivas. Ademais, como mencionado anteriormente, diversos estudos em roedores já associaram o sono REM à formação de memórias emotivas (Genzel *et al.*, 2015; Ackerman *et al.*, 2015; Bodt *et al.*, 2023), apesar de alguns não relatarem a dinâmica da

potência de teta durante REM. Portanto, é possível que, se a tarefa escolhida para os experimentos desse estudo tivesse algum efeito aversivo ou recompensador, uma diferença na potência de teta seria observada em PL, tanto no pré-frontal, quanto no hipocampo.

Ainda, os efeitos das oscilações teta durante REM também foram observadas em roedores para tarefas neutras. Boyce *et al.* (2018) ao abolirem optogeneticamente as oscilações teta durante o sono REM, efetivamente reduzindo sua potência no hipocampo, prejudicaram a formação de memória espacial no TLO. No entanto, cabe ressaltar que a dinâmica entre diferentes regiões cerebrais não foram avaliadas nesse trabalho, portanto é possível que a perturbação de teta tenha gerado prejuízo na memória em TLO não por causa da potência de teta em si, mas pelo prejuízo provocado na dinâmica de teta entre o hipocampo e outras regiões, como o PFC. De fato, evidências apontam que a comunicação entre diferentes áreas durante REM parece ter um papel mais importante para a consolidação de memória que a potência do sinal local em si (Hutchison e Rathore, 2015; Klinzing *et al.*, 2019, Genzel *et al.*, 2015; Ackerman *et al.*, 2015).

#### **5.4 A coerência de teta e delta e a correlação entre a coerência de fase em teta durante REM com o índice de discriminação.**

A sincronização entre oscilações de diferentes áreas e o grau de sincronização parece refletir a força da conectividade entre elas (John, 2002; Edelman e Ttoni, 2000). Além disso, a comunicação de longas distâncias no cérebro parece depender dessa sincronização em frequências e fases específicas (Engel *et al.*, 2001; Fries *et al.*, 2015). A partir disso, conforme descrito nos métodos, utilizamos medidas como a coerência espectral e a coerência de fase entre diferentes regiões como uma maneira de avaliar indiretamente a conectividade entre CA1 e mPFC durante o sono. A coerência de fase mede a sincronização entre diferentes regiões cerebrais com base na fase do sinal das frequências, enquanto que a coerência espectral mede a modulação entre diferentes regiões com base, principalmente, na amplitude do sinal das frequências (Siegel *et al.*, 2012).

O sono REM naturalmente possui maior coerência em teta quando comparado com outros estados comportamentais (Mondino *et al.*, 2020), principalmente em se tratando do hipocampo, uma vez que hipotetiza-se que é essa a frequência utilizada por essa região para comunicar com outras (Fogel *et al.*, 2009). No entanto, a coerência pode ser ainda maior após tarefas de aprendizado. Em ratos, por exemplo, uma alta coerência espectral em REM é encontrada entre a amígdala, hipocampo e mPFC e está associada com consolidação de memórias aversivas

(Popa, 2010; Klinzing, 2019). Lobato *et al.* (2022) também encontraram aumento de coerência espectral de teta entre córtex e hipocampo durante o sono REM após aprendizagem da tarefa de localização de objetos modificada, na qual ratos eram expostos a cinco trials com 2 objetos idênticos variando a posição para cada trial. No entanto, o grupo não chegou a correlacionar este aumento com o desempenho dos animais na tarefa, não sendo possível saber se o aumento de coerência está relacionado ao desempenho individual de cada animal ou se é um fenômeno provocado pela tarefa em si.

Em nossos experimentos, não observamos efeitos do aprendizado no aumento da coerência tanto espectral quanto de fase. Novamente, este efeito pode estar relacionado à ausência de valência emocional do TLO, como também pode estar relacionado à dificuldade da tarefa, cuja execução é mais simples que a tarefa realizada por Lobato *et al.* (2022). No entanto, o número limitado de estudos que incluem tarefas não emocionais para esse tipo de análise dificulta concluir que aumento de coerência poderia estar ligado somente a tarefas emotivas. Em nosso experimento, por exemplo, apesar de não termos um valor de  $p$  menor que 0,05, observamos um aumento na coerência de fase em teta de em média 3,7% e na coerência espectral em teta de em média 3,9% durante o sono REM após aprendizagem (respectivamente: teste-t pareado one-tailed:  $p=0,09$  e  $p=0,11$ ), e esse aumento parece expressivo em cinco dos sete animais (de 7%, em média, para esses animais), dado que sugere algum efeito do aprendizado na coerência e que poderia ficar mais evidente com um  $N$  amostral maior. Ademais, neste projeto também observamos uma correlação positiva entre a coerência de fase em teta durante REM com os DIs dos animais no TLO (correlação de Pearson,  $p=0,04$  e  $r=0,69$ ). Esse dado, além de inédito na literatura, é mais uma indicação de que o sono REM possui participação na consolidação de memórias espaciais. Além disso, reforça a ideia das oscilações teta atuando como um sincronizador de regiões e integrador dos traços de memória.

Ademais, outras análises em relação à coerência, sincronização e comodulação poderiam nos trazer novas informações sobre o papel de teta durante REM na formação de memórias. Por exemplo, o acoplamento teta-gama-rápido, no qual a fase de teta modula a amplitude de oscilações mais rápidas (110-150 Hz) e vice versa (a amplitude de gama modulando a fase de teta) é maior durante o sono REM (Montgomery *et al.*, 2008; Scheffer-Teixeira e Tort, 2017; Klinzing *et al.*, 2019). Inclusive, foi demonstrado por Montgomery *et al.* 2008 que o aumento da coerência de teta durante REM no giro denteado ocorre junto com a redução da coerência em gama entre CA1 e CA3 e esse fenômeno poderia estar atrelado à separação de padrões a

serem evocados futuramente no estado acordado. Ademais, Cavelli *et al.* (2017) encontraram no EEG uma alta coerência de fase entre teta e as oscilações gama rápidas, e sugeriram que esse fenômeno pode ter relação com a cognição, uma vez que as oscilações rápidas parecem ter papel no processamento de memórias (Tort *et al.*, 2013). É possível, então, que em nossos dados encontremos algum aumento desse tipo de acoplamento no hipocampo após aprendizagem, e talvez até mesmo uma correlação com DI.

Por fim, apesar de não ser uma medida de coerência e comodulação, é possível também correlacionar eventos oscilatórios que acontecem durante o sono REM com eventos que acontecem no sono NREM. Por exemplo, após tarefa de Two-Way Active Avoidance Test em ratos, foi observado que o aumento da atividade de teta no EEG durante REM está associado com o aumento de atividade de *spindles* no sono NREM subsequente (Fogel *et al.*, 2009). Isso demonstra que possivelmente o papel de oscilações teta no sono REM complementa o de oscilações presentes no sono NREM e reforça a ideia da hipótese sequencial do sono, na qual sono REM e NREM possuem papéis complementares para formação de memória (Fogel *et al.*, 2009; Buzsaki, 1989).

### **5.5 As implicações da causalidade de Granger.**

Uma vez confirmada a correlação entre coerência de fase e DI, foi importante compreender mais a fundo a origem da modulação em teta entre essas duas regiões. A análise de coerência de fase não quantifica as relações direcionais entre as regiões, portanto para abordar a direcionalidade do fluxo de informação, recorreremos à causalidade de Granger.

Durante comportamentos espaciais, a causalidade de Granger na faixa de teta parece aumentar na direção hipocampo-PFC (Tavares e Tort, 2022). Ademais, trabalhos como os de Koike *et al.* (2017) e Almeida-Filho *et al.* 2021 constataram que havia valores significativos de causalidade de Granger dentro da faixa teta durante REM na direção do hipocampo para o córtex retrosplenial. Isso sugere que há um fluxo predominante de informação saindo hipocampo na faixa de teta para regiões corticais. De fato, em nossos dados, observamos uma causalidade de Granger expressiva em teta durante REM na direção de CA1 para mPFC, corroborando a hipótese de que o hipocampo modula a comunicação entre regiões utilizando-se dessa faixa de frequência.

Esses resultados estão em consonância com estudos anteriores que também observaram valores significativos de causalidade de Granger dentro da faixa teta durante REM na direção do hipocampo para o córtex (Koike *et al.*, 2017). Entretanto, tais descobertas instigam questões

sobre os substratos neurais e as vias específicas responsáveis pela modulação observada.

Sabe-se que as oscilações teta são geradas a partir da atividade rítmica de neurônios GABAérgicos do Septo Medial (Adamantidis *et al.*, 2019). No entanto, a comunicação entre o hipocampo e o PFC pode ocorrer tanto através de uma projeção direta de CA1 ventral para o mPFC quanto por meio de outras vias, como o núcleo reuniens (Chao *et al.*, 2017). Adicionalmente, existem projeções de CA1 para o subículo, córtex entorrinal, córtex orbitofrontal, entre outras regiões, as quais, por sua vez, podem estar associadas à atividade do mPFC (Ciocchi, 2015, Zangbar *et al.* 2018). Assim, uma variedade de vias modulatórias poderia potencialmente contribuir para a comunicação em teta entre o hipocampo e o mPFC. No entanto, mais estudos sobre essas vias seriam necessários para compreender melhor a relação causal de coerência de teta entre CA1 e mPFC.

## **5.6 Limitações do estudo.**

É importante ressaltar que o projeto realizado aqui possui limitações inerentes. Para começar, o baixo N de animais ( $n = 7$ ) poderia explicar em parte porque algumas diferenças esperadas não foram obtidas. Inclusive, com um número maior de animais, seria possível separar os que desempenharam bem no TLO e os que não desempenharam bem, possibilitando uma comparação entre grupos que não foi possível neste estudo. Ademais, a utilização de um estereotrodo com 2 canais, apesar de aumentar as chances de atingir a camada piramidal de CA1 quando comparado a um eletrodo monopolar, ainda assim dificulta o posicionamento exato deles na camada desejada. Uma matriz com mais canais seria o ideal para garantir uma análise que leva em consideração as mesmas camadas de CA1 entre animais. Ademais, apesar do uso das ripples ser um método confiável para a confirmação do posicionamento do eletrodo, ainda assim é importante os dados das análises histoquímicas, que ainda não foram finalizadas.

Por fim, é fundamental salientar que todas as conclusões derivadas deste estudo se restringem a ratos do sexo masculino, destacando a necessidade premente de investigações envolvendo fêmeas. Tais estudos não apenas aprimorariam a compreensão do papel do sono na consolidação da memória, mas também enriqueceriam o conhecimento no campo da neurofisiologia, considerando a predominância das pesquisas realizadas em indivíduos do sexo masculino.

### **5.7 Conclusões e próximos passos.**

Neste estudo, obtivemos evidências que favorecem a ideia de que o sono REM parece desempenhar papel na formação de memória. As principais evidências para isso são a redução de latência para o sono REM e a correlação entre a coerência de fase em teta durante REM entre CA1 e mPFC com o desempenho dos animais no TLO. Apesar de ser bem relatado o papel do sono REM para memórias afetivas, este trabalho sugere que ele também tenha um papel em memórias espaciais neutras, contribuindo com evidências até agora inéditas.

No entanto, para compreender melhor a relação do sono REM com a corticalização, seria necessário 1) aumentar o número de sujeitos, incluindo análises com fêmeas, 2) avaliar outros tipos de modulação, como teta-gama, 3) associar fenômenos do sono REM com o sono NREM, a fim de avançar nos estudos da hipótese sequencial do sono, 4) fazer análises semelhantes em outros testes comportamentais, de memória espacial e emocional (ver materiais suplementares), 5) aplicar técnicas de malha fechada para detectar oscilações teta durante REM e inibi-las em tempo real, para avaliar as consequências da abolição da coerência em teta (ver materiais suplementares) e 6) analisar com mais detalhe a coerência de fase em relação à fase preferencial de acoplamento antes e depois do aprendizado.

## 6 MATERIAL SUPLEMENTAR

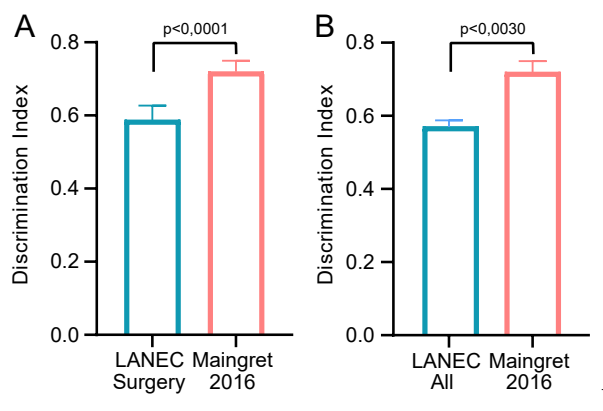
Este projeto inclui dados suplementares em relação à padronização de testes comportamentais e ao desenvolvimento de um detector de oscilações teta.

### 6.1 Padronização de testes de memória espacial

Alguns processos mnemônicos dependentes de hipocampo podem ser estudados em roedores por meio de tarefas comportamentais, em especial, tarefas para memória espacial (Morellini, 2013). A interpretação de respostas comportamentais de animais, no entanto, não é uma tarefa simples, e por isso diferentes testes foram desenvolvidos ao longo dos anos para melhor compreender o estado animal. Uma forma de observar a memória espacial é pela navegação do animal em certo ambiente e como ele explora o contexto em que se encontra. Nesse contexto, os testes comportamentais medem o desempenho animal para inferir o aprendizado (Morellini, 2013).

Sendo assim, para este estudo, o TLO foi a tarefa que, a princípio, melhor responderia nossas perguntas em relação a corticalização de memórias espaciais. No entanto, ao padronizar o TLO tendo como referência o artigo do Maingret *et al.* (2016) (n=6), observamos que os animais em nossos testes comportamentais (n=39) possuíam um índice de discriminação significativamente menor (teste-t não pareado, -20%, p=0,003) (**Figura 15B**). Questionamos se o fato de utilizarmos os ratos Wistar, linhagem albina com baixa visão é diferente da linhagem que Maingret *et al.* (2016) utilizaram (Sprague-Dawley), pudesse possivelmente explicar o baixo desempenho médio dos nossos animais. De fato outro artigo que usa animais Wistar chegou em resultados semelhantes aos nossos (Ozawa *et al.*, 2011), e ainda demonstrou que quanto maior o tempo de exposição ao objeto, melhor o desempenho do animal. No entanto, uma análise mais detalhada desse comportamento ainda se faz necessário, uma vez que há resultados muito variados para o TLO conforme o trabalho, e a reprodutibilidade dos resultados como os do Maingret *et al.* (2016) parece baixa.

Portanto, a fim de que pudéssemos garantir um desempenho melhor dos animais para concluir que eles efetivamente retiveram ou não memória espacial, fomos em busca de padronizar outros protocolos que melhor se adaptassem à linhagem Wistar. Os protocolos testados foram o TLO com dupla exposição, o teste de localização espontânea de objeto (TLEO) e o labirinto de Barnes (LB).



**Figura 15:** Gráficos de barras comparando resultados do TLO obtidos neste projeto com os resultados obtidos na bibliografia de referência (Maingret et al 2016). **(A):** Comparação entre animais que passaram pela cirurgia e a referência (n=7 e n=6). Animais que passaram pela cirurgia tiveram um desempenho significativamente menor que animais referência (-18,3%,  $p < 0,0001$ ). **(B):** Comparação com todos animais que passaram pelo TLO no LANECE (n=39), e animais do LANECE tiveram desempenho significativamente menor (-20%,  $p = 0,003$ ).

### 6.1.1 Teste de Localização de Objetos com dupla exposição

Conforme explicado nos métodos, o TLO é utilizado para averiguar a memória espacial, e mede a preferência espontânea de roedores pela novidade (Ennaceur e Delacour, 1988; Ennaceur, Neave, Aggleton, 1997). No entanto, para garantir que o objeto deslocado realmente tivesse um efeito de novidade, resolvemos testar este paradigma utilizando duas exposições, uma vez que há evidência de que mais tempo de aquisição melhora o desempenho animal (Ozawa *et al.*, 2011). Dessa forma, os animais passaram por dois dias de exposição aos objetos (n=11), por 20 minutos cada dia (**Figura 16A**), e depois uma evocação de 5 minutos, como no protocolo original do TLO. O DI é calculado de forma idêntica ao do TLO com única exposição, tendo o tempo de exploração do dia de evocação como referência. No entanto, o desempenho dos animais ainda assim foi significativamente menor que os animais do Maingret *et al.* (2016) (-24%, teste-t não pareado,  $p = 0,0021$ ) e não foi muito diferente TLO com exposição única de 30 minutos (teste-t não pareado,  $p = 0,52$ ) (**Figura 16D**).

### 6.1.2 Teste de localização espontânea de objetos (spontaneous location recognition task em inglês).

De forma semelhante ao TLO, o teste de localização espontânea de objetos também avalia a memória espacial de animais, medindo a preferência de roedores pela novidade (Reichelt *et al.*, 2021). No entanto, neste paradigma, é possível testar a nível de separação de padrão que o



animal possui de acordo com a similaridade do contexto de cada um dos objetos. Para isso são utilizados 3 objetos idênticos durante a fase de aquisição (10 minutos) e na fase de evocação 24 horas depois (por 5 minutos) dois objetos são removidos e um, também idêntico, é colocado no ponto equidistante a esses dois objetos retirados (**Figura 16B**). Quanto mais próximo os dois objetos a serem substituídos estão na aquisição, mais difícil diferenciar o contexto do novo objeto como sendo novidade na fase de evocação. No entanto, para testar o protocolo, iniciamos com o paradigma no qual os 3 objetos inicialmente estavam em posições equidistantes, de modo que, ao serem substituídos, o objeto novo ficaria claramente em um contexto diferente, tornando o reconhecimento mais fácil para o animal (n=8).

O índice de discriminação para este paradigma também foi calculado com base no tempo de exploração no objeto antigo e no novo, de forma idêntica ao que calculamos o DI de OLT. Nossos resultados foram semelhantes aos obtidos por outros trabalhos citados pelo protocolo (Gilchrist *et al.*, 2021; Hueston *et al.*, 2018), no entanto, ainda assim a discriminação é mais baixa que a obtida pelo Maingret *et al.* (2016), e não muito diferente da discriminação do OLT.

### 6.1.3 Labirinto de Barnes

Criado em 1979 por Barnes, o LB mede o tempo necessário para um animal encontrar a caixa de escape de uma plataforma circular elevada (Barnes, 1979). O teste é dividido em diferentes fases: uma fase de habituação à plataforma elevada, uma fase de aquisição da localização da caixa de escape, e uma fase de teste, na qual o buraco da caixa é tampado e a retenção de memória do animal é medida pelo tempo que ele passa explorando a área onde havia a caixa (Gawel *et al.*, 2019). É esperado que ao longo dos dias e das repetições o tempo que o animal leva para encontrar o escape diminua (Gawel *et al.*, 2019).

Já existem estudos que trazem evidências do papel do sono no desempenho do animal no LB. Soto-Rodriguez *et al.* (2016) mostraram que a privação de sono por meio do paradigma de múltiplas plataformas flutuantes, na qual os animais caem na água quando perdem tônus muscular durante REM, prejudica a performance dos ratos no LB. Ademais, Rajizadeha *et al.* (2020) mostrou que a privação de sono REM, utilizando também do paradigma de múltiplas plataformas flutuantes, reduz a performance de ratas fêmeas no LB e impacta mecanismos indutores de LTP. Dessa forma, o LB surgiu também como uma boa alternativa de teste espacial para este projeto.

O protocolo de LB utilizado como referência foi o trabalho desenvolvido anteriormente no

LANEC (Rêgo, 2014). O labirinto constitui de uma plataforma circular preta, com 12 buracos a uma altura de 1,50m do solo. A plataforma fica a uma luminosidade considerada aversiva para os ratos, a fim de estimular que procurem a caixa de escape.

Durante 4 dias, os animais (n=5) passaram por 4 trials, nos quais tinham 3 minutos para explorar a plataforma e encontrar a caixa de escape, sendo o cronômetro pausado assim que entrasse na caixa. Antes dos trials eles ficaram 10 minutos em uma caixa separada para se habitarem à sala, e entre cada trial o animal esperava 5 minutos nessa mesma caixa. Para colocar o animal na plataforma, foi utilizado uma pequena caixa plástica, que era virada no centro e, depois de 15 segundos, tirada para liberar o animal para exploração. Uma vez dentro da caixa de escape, o animal permanecia ali durante 1 minuto, também para se habituar ao espaço. Seu aprendizado foi contabilizado não apenas pelo tempo necessário para encontrar o escape, mas também pela estratégia utilizada e número de erros para encontrar o escape (**Figura 16C**). Os erros são classificados em dois tipos: o erro primário ou o erro secundário. No erro primário, calcula-se o número de buracos errados o animal olhou antes de encontrar o correto, considerando-se apenas a primeira vez, e no erro secundário calcula-se todas as outras vezes que o animal procurou novamente em um buraco errado (Pitts, 2018).

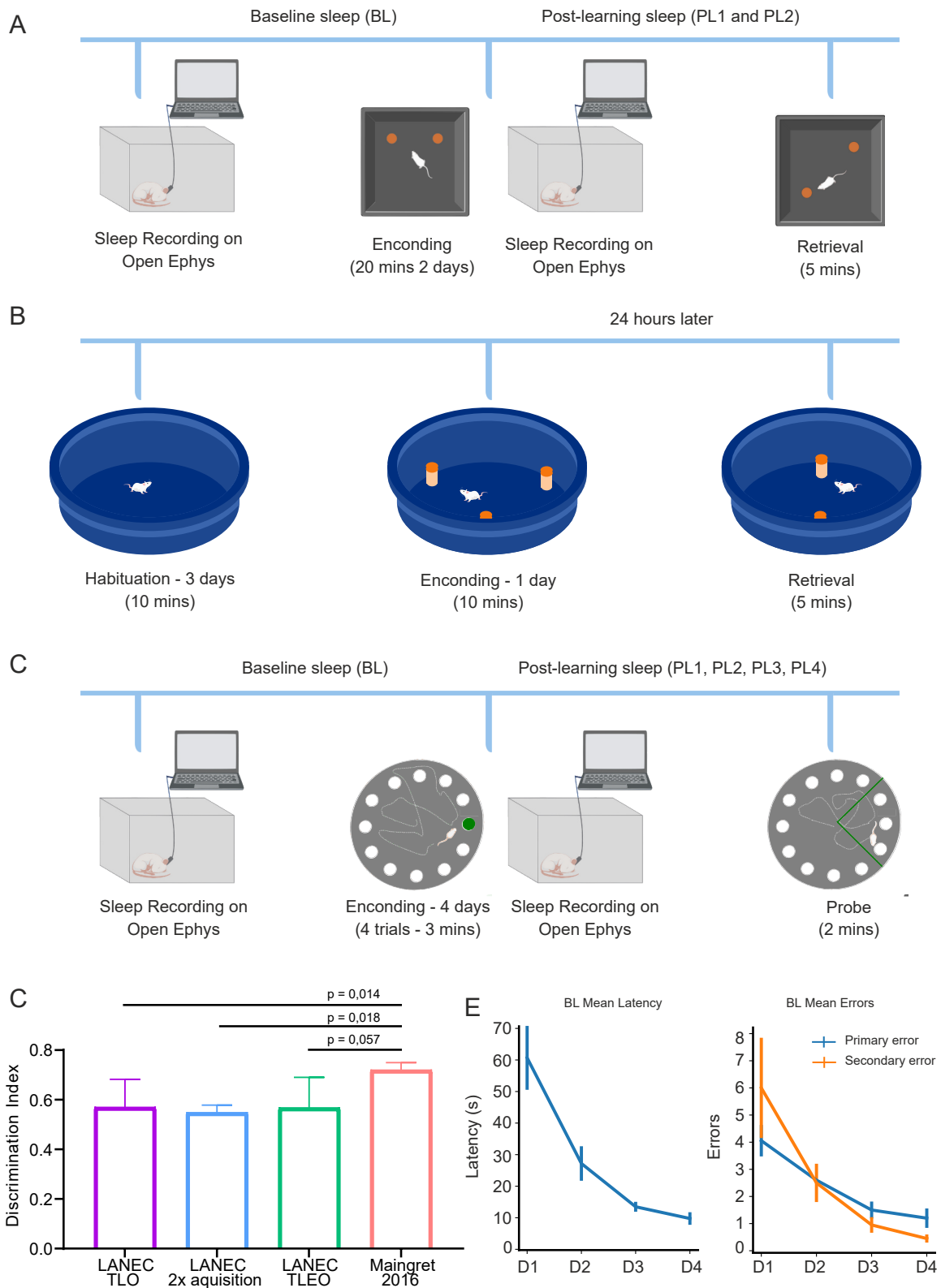
No dia do teste, a caixa foi substituída por uma placa, tampando o buraco. O animal foi posicionado no centro da plataforma, novamente utilizando-se da pequena caixa plástica, e então liberado para explorar durante 2 minutos. Sua retenção de memória foi medida com base no tempo despendido no quadrante onde anteriormente tinha o buraco de escape.

Para as análises, além de serem cronometradas manualmente, utilizou-se o treinamento de inteligência artificial do DeepLabCut para avaliar outros parâmetros de comportamento (Mathis, 2018). No entanto, ainda não estão completamente analisadas. Os testes de todos os animais se iniciaram às 10:30, e o animal foi colocado logo em seguida para registro de sono no Open Ephys de 11:30 - 17:00. Os dados do registro também ainda estão em análise.

## **6.2 Detecção de teta**

Conforme discutido, os próximos passos para esse projeto incluem a utilização de estímulos para prejudicar a sincronização entre mPFC e CA1. Para isso, é preciso uma detecção em tempo real de eventos oscilatórios, como teta. Sendo assim, já está em andamento a etapa da confecção de um detector de teta durante REM.

Para este detector, utilizaremos diferentes plugins disponibilizados pelo Open Ephys, sendo

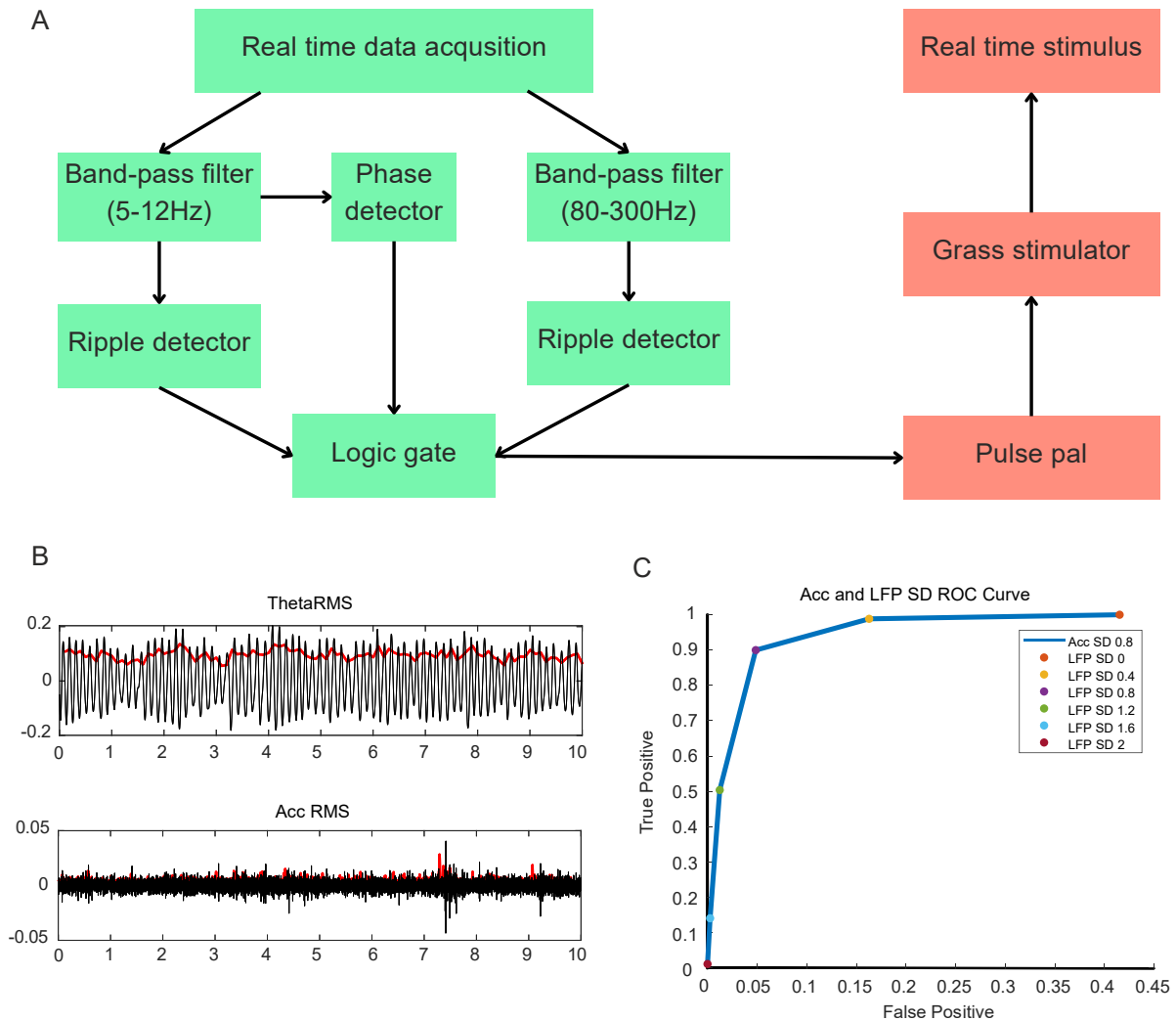


**Figura 16:** (A): Desenho experimental do TLO com duas aquisições. (B): Desenho experimental do TLEO. (C): Desenho experimental do LB. (D): Índices de discriminação dos diferentes testes comparados com o do Maingret et al 2016. (E): Resultados preliminares das análises do BL. Na direita temos a latência média em segundos para encontrar o buraco de escape a cada dia e na esquerda tempos o número de erros primários e secundários médios para cada dia.

um deles o detector de ripples, desenvolvido pelo nosso próprio grupo (Sousa *et al.*, 2022). Para determinar que um animal entrou efetivamente em sono REM, há dois parâmetros importantes para serem avaliados: a amplitude de teta e a movimentação do animal. Sendo assim, o nosso detector de teta funciona utilizando o módulo de detecção de movimento animal do detector de ripples, e adaptando as frequências de interesse e os limiares de amplitude, é possível fazer com que o detector de movimento também detecte teta (**Figura 17**).

Para determinar quais os melhores parâmetros de amplitude de teta e de movimento, utilizamos dados de classificação de sono de um animal já registrado. Com base no RMS do sinal bruto do LFP do hipocampo e do RMS do sinal bruto do acelerômetro durante REM é possível testar diferentes limiares de desvio padrão da média no qual a detecção tem uma maior taxa de verdadeiro positivo e menor taxa de falso positivo. Ou seja, é preciso encontrar o ponto no qual o acelerômetro tem a menor movimentação e teta a maior amplitude e que as chances desse estado ser REM sejam altas. No gráfico é possível visualizar resultados preliminares das taxas de verdadeiro e falso positivo, no qual cada ponto colorido representa um diferente desvio padrão acima da média do RMS do LFP do hipocampo na faixa de teta. Neste exemplo, foi utilizado como parâmetro de baixa movimentação o RMS do acelerômetro com 0.8 desvios padrões abaixo da média.

Uma vez que a oscilação teta for detectada no hipocampo em tempo real, é possível aplicar no PFC estímulos elétricos em malha fechada e de forma aleatória para desestabilizar as oscilações teta que chegam por vias eferentes. Ainda, poderíamos utilizar o plugin de detecção de fase para fazer estímulos em fase com teta e assim aumentar a potencia dessa oscilação e a sincronia entre regiões. No entanto, este tipo de teste ainda não foi feito em nosso laboratório.



**Figura 17:** (A): Esquema dos equipamentos e plugins utilizados para a detecção de REM e estímulo. Inicialmente utiliza-se o dado bruto em tempo real sendo registrado pelo Open Ephys e o software do Open Ephys utiliza plugins como o Bandpass filter para filtrar na frequência desejada (na de teta e do acelerômetro). Esses dados filtrados são alimentados para o detector de ripples que calcula o RMS em tempo real do dado, extraindo um valor de potência da frequência para um intervalo pré-determinado e avaliando se ela passa ou não do limiar pré-estabelecido. Se o RMS de teta passa do limiar e o RMS do acelerômetro se mantém abaixo do limiar, o plugin de porta lógica permite o envio de um pulso elétrico usando o pulse pal e o estimulador Grass. (B): Exemplos de oscilações teta do hipocampo (acima) e do acelerômetro (abaixo) para testar os melhores limiares a serem alimentados no sistema de detecção. Em preto tem-se o dado bruto e em vermelho o RMS calculado para aquele dado. (C): Exemplo de curva ROC para a detecção de REM com base no acelerômetro com 0.8 desvios padrões abaixo da média, onde no eixo X tem-se o falso positivo e no Y o verdadeiro positivo. Cada ponto colorido representa um limiar de desvio padrão para a amplitude de teta. Neste exemplo, o dado com maior verdadeiro positivo e menos falso positivo para detecção de REM é o RMS de teta com 0.8 desvios padrões acima da média.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- ACKERMANN S. & RASCH, B. Differential effects of non-REM and REM sleep on memory consolidation? *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 14, 2014.
- ADAMANTIDIS, Antoine R.; HERRERA, GUTIERREZ, Carolina; GENT, Thomas C. Oscillating circuitries in the sleeping brain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 20, n. 12, p. 746-762, 2019.
- ALMEIDA-FILHO, Daniel G.; QUEIROZ, Claudio M.; RIBEIRO, Sidarta. Memory corticalization triggered by REM sleep: mechanisms of cellular and systems consolidation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 75, n. 20, p. 3715-3740, 2018.
- ALMEIDA-FILHO, D.G., KOIKE, B.D., BILLWILLER, F. *et al.* Hippocampus-retrosplenial cortex interaction is increased during phasic REM and contributes to memory consolidation. *Sci Rep* 11, 13078, 2021
- ASERINSKY E. & KLEITMAN N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*. 118(3062):273-4, 1953.
- BARNES, C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp. Physiol. Psychol.*, 93:74-104, 1979.
- BECEGATO M & SILVA RH. Object recognition tasks in rats: Does sex matter? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 12;16:970452, 2022.
- BENCHENANE, Karim *et al.* Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal-prefrontal network upon learning. *Neuron*, v. 66, n. 6, p. 921-936, 2010.
- BENINGTON, J. H. & FRANK, M. G. Cellular and molecular connections between sleep and synaptic plasticity. *Progress in Neurobiology*, 69(2), 71–101, 2003.
- BERLUCCHI, Giovanni & BUCHTEL, Henry A. Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning. *Experimental brain research*, v. 192, n. 3, p. 307-319, 2009.
- BINDER, Sonja *et al.* Sleep enhances memory consolidation in the hippocampus-dependent object-place recognition task in rats. *Neurobiology of learning and memory*, v. 97, n. 2, p. 213-219, 2012.
- BIDERMAN, Natalie; BAKKOUR, Akram; SHOHAMY, Daphna. What are memories for? The hippocampus bridges past experience with future decisions. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 24, n. 7, p. 542-556, 2020.
- BLISS, Tim VP; LØMO, Terje. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of*

physiology, v. 232, n. 2, p. 331-356, 1973.

BONTEMPI, Bruno; DURKIN, Thomas P. Dynamics of hippocampal-cortical interactions during memory consolidation: insights from functional brain imaging. In: *Memories: Molecules and Circuits*, p. 19-39, 2007.

BOYCE, R., GLASGOW, S. D., WILLIAMS, S., & ADAMANTIDIS, A.. Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science*, v. 352, n. 6287, p. 812-816, 2016.

BRESSLER, S. L.; SETH, A. K. Wiener-Granger causality: a well established methodology. *Neuroimage*, v. 58, n. 2, p. 323-329, 2011.

BUZSÁKI, György. Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states. *Neuroscience*, v. 31, n. 3, p. 551-570, 1989.

BUZSAKI, G; HORVATH, Z; URIOSTE, R; HETKE, J; WISE, K. High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science*, 256(5059), 1025–1027, 1992.

BUZSAKI, G. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science*, 304(5679), 1926–1929, 2004.

BUZSAKI, G.; ANASTASSIOU, C.A.; KOCH, C. The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 407–420, 2012.

CANOLTY, Ryan T.; KNIGHT, Robert T. The functional role of cross-frequency coupling. *Trends in cognitive sciences*, v. 14, n. 11, p. 506-515, 2010.

CANTERO, J.L.; ATIENZA, M.; SALAS, R.M. Clinical value of EEG coherence as electrophysiological index of cortico-cortical connections during sleep. *Rev. Neurol.* 31, 442–454, 2000.

CAVELLI, M.; CASTRO-ZABALLA, S.; MONDINO, A.; GONZALEZ, J.; FALCONI, A.; TORTEROLO, P. Absence of EEG gamma coherence in a local activated neocortical state: A conserved trait of REM sleep. *Transl. Brain Rhythms*. 2, 1–13, 2017.

CIOCCHI, S. et al. Selective information routing by ventral hippocampal CA1 projection neurons. *Science*, v. 348, n. 6234, p. 560-563, 2015.

COHEN, Harry B. & DEMENT, William C. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of “paradoxical” phase. *Science* 1318-1319, 1965.

COOKE, Samuel Frazer; BLISS, Timothy VP. Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, v. 129, n. 7, p. 1659-1673, 2006.

DALGALARRONDO, Paulo. *Psicopatologia e semiologia dos transtornos mentais*. Artmed Editora, 2018.

- DATTA, S. Avoidance task training potentiates phasic pontine-wave density in the rat: A mechanism for sleep-dependent plasticity. *J Neurosci.* 20(22):8607-13, 2000.
- DATTA, S. & OLIVER, M. D. Cellular and molecular mechanisms of REM sleep homeostatic drive: a plausible component for behavioral plasticity. *Front. Neural Circuits* 11:63, 2017.
- DENNINGER, J. K.; SMITH, B. M.; KIRBY, E.D. Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget. *J Vis Exp.* 141, 2018.
- DIEKELMANN, Susanne & BORN, Jan. The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 11, n. 2, p. 114-126, 2010.
- EDELMAN, G.M. & TONONI, G. *A Universe of Consciousness.* Basic Books, New York, NY, USA, 2000.
- EICHENBAUM, Howard. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behavioural brain research*, v. 127, n. 1-2, p. 199-207, 2001.
- ENNACEUR, A & DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I. Behavioural data. *Behav Brain Res* 31:47–59,1988.
- ENNACEUR, A; NEAVE, N; AGGLETON, JP. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Experimental Brain Research* 113:509–19, 1997.
- FLORESCO, Stan B.; SEAMANS, Jeremy K.; PHILLIPS, Anthony G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 5, p. 1880-1890, 1997.
- FOGEL, S.M., SMITH, C.T. and BENINGER, R.J.. Evidence for 2-stage models of sleep and memory: learning-dependent changes in spindles and theta in rats. *Brain research bulletin*, 79(6), pp.445-451, 2009.
- FRIES P. Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. *Neuron.* v. 88, n 1, p. 220-35, 2015
- GAIS, Steffen *et al.* Sleep transforms the cerebral trace of declarative memories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 47, p. 18778-18783, 2007.
- GAO, Richard. Interpreting the electrophysiological power spectrum. *Journal of Neurophysiology*, 115(2), 628–630, 2016.
- GENZEL, L; SPOORMAKER, V; KONRAD, B; DRESLER, M. The role of rapid eye movement sleep for amygdala-related memory processing. *Neurobiology of Learning and Memory* 122:110e21, 2015.



- GILCHRIST CP, CUMBERLAND AL, KONDOS-DEVCIC D, Hill RA, KHORE M, QUEZADA S, REICHEL T AC, TOLCOS M. Hippocampal neurogenesis and memory in adolescence following intrauterine growth restriction. *Hippocampus*. 31(3):321-334, 2021.
- GIRARDEAU, G., BENCHENANE, K., WIENER, S. I., BUZSÁKI, G., & ZUGARO, M. B.. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nature neuroscience*, v. 12, n. 10, p. 1222-1223, 2009.
- GIRARDEAU, Gabrielle; INEMA, Ingrid; BUZSÁKI, György. Reactivations of emotional memory in the hippocampus–amygdala system during sleep. *Nature neuroscience*, v. 20, n. 11, p. 1634-1642, 2017.
- HANNEVIN E, HARS B, MAHO C, BLOCH V. Processing of learned information in paradoxical sleep: relevance for memory. *Behav Brain Res*. 69(1-2):125-35, 1995.
- HUESTON, C.M., O'LEARY, J.D., HOBAN, A.E., KOZAREVA, D.A., PAWLEY, L.C., O'LEARY, O.F., CRYAN, J.F. and NOLAN, Y.M. Chronic interleukin-1 $\beta$  in the dorsal hippocampus impairs behavioural pattern separation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 74, pp.252-264, 2018.
- HUTCHISON, Isabel C.; RATHORE, Shailendra. The role of REM sleep theta activity in emotional memory. *Frontiers in psychology*, v. 6, p. 1439, 2015.
- JENKINS, John G., and KARL M. Dallenbach. "Obliviscence during sleep and waking." *The American Journal of Psychology* 35.4 (1924): 605-612.
- JABLONSKI, S. A.; SCHREIBER, W. B.; WESTBROOK, S. R.; BRENNAN, L. E.; STANTON, M. E. Determinants of novel object and location recognition during development. *Behav Brain Res*. 2013 Erratum in: *Behav Brain Res*. 2014 Oct 1
- JOHN, E.R. The neurophysics of consciousness. *Brain Res. Rev.* 39, 1–28, 2002.
- JOUVET, D.; VIMONT, P.; DELORME, F.; JOUVET, M. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, v. 158, n. 4, p. 765, 1964.
- KANDEL, Eric R. & SQUIRE, Larry R. Neuroscience: Breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. *Science*, v. 290, n. 5494, p. 1113-1120, 2000.
- KIM SM, ZHANG S, PARK J, SUNG HJ, TRAN TT, CHUNG C, HAN IO. REM Sleep Deprivation Impairs Learning and Memory by Decreasing Brain O-GlcNAc Cycling in Mouse. *Neurotherapeutics*. 18(4):2504-2517.
- KITAMURA T, OGAWA SK, ROY DS, OKUYAMA T, MORRISSEY MD, SMITH LM, REDONDO RL, TONEGAWA S. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*. 7; 356(6333), p. 73-78, 2017

- KLINZING, Jens G.; NIETHARD, Niels; BORN, Jan. Mechanisms of systems memory consolidation during sleep. *Nature neuroscience*, v. 22, n. 10, p. 1598-1610, 2019.
- LE BON, Olivier. An Asymmetrical Hypothesis for the NREM-REM Sleep Alternation—What Is the NREM-REM Cycle?. *Frontiers in Neuroscience*, v. 15, p. 372, 2021.
- LOBATO, Irene Navarro; ALEMAN-ZAPATA, Adrian; SAMANTA, Anumita; BOGERS, Milan; NARAYANAN, Shekhar; RAYAN, Abdelrahman; ALONSO, Alejandra; VAN DER MEIJ, Jacqueline; KHAMASSIZADEH, Mehdi; KHAN, Zafar U.; GENZEL, Lisa. Increased cortical plasticity leads to memory interference and enhanced hippocampal-cortical interactions. *eLife*, v. 12, p. e84911, 2023.
- LUCERO, M. Lengthening of REM sleep duration consecutive to learning in the rat. *Brain Res.* 20, 319–322, 1970.
- MAINGRET, Nicolas *et al.* Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nature neuroscience*, v. 19, n. 7, p. 959-964, 2016.
- MARSHALL, Lisa *et al.* Brain rhythms during sleep and memory consolidation: neurobiological insights. *Physiology*, v. 35, n. 1, p. 4-15, 2020.
- MATHIS, A., MAMIDANNA, P., CURY, K. M., ABE, T., MURTHY, V. N., MATHIS, M. W., & BETHGE, M. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature neuroscience*, 21(9), 1281-1289, 2018.
- MCCOY, J. G., & STRECKER, R. E. The cognitive cost of sleep lost. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(4), 564–582, 2011. MCDERMOTT, C. M.; LAHOSTE, G. J.; CHEN, C.; MUSTO, A.; BAZAN, N.G.; MAGEE, J. C. Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 23(29):9687-95, 2003.
- MEDINA, J. H., BEKINSCHTEIN, P., CAMMAROTA, M., & IZQUIERDO, I.. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural Brain Research*, v. 192, n. 1, p. 61-69, 2008.
- MENDES, R.V. Desenvolvimento e validação de um Toolbox de código aberto para classificação de sono de roedores. Tese (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2021
- MILINSKI, L., FISHER, S.P., CUI, N. et al. Waking experience modulates sleep need in mice. *BMC Biol* 19, 65, 2021.
- NORIMOTO, Hiroaki *et al.* Hippocampal ripples down-regulate synapses. *Science*, 359,1524-1527, 2018.

- O'NEILL, Joseph *et al.* Reactivation of experience-dependent cell assembly patterns in the hippocampus. *Nature neuroscience*, v. 11, n. 2, p. 209-215, 2008.
- O'KEEFE J, DOSTROVSKY J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34(1) p. 171-5, 1971
- PAGEL, J., PEGRAM, V., VAUGHN, S., DONALDSON, P., & BRIDGERS, W. The relationship of REM sleep with learning and memory in mice. *Behavioral Biology*, 9(3), 383–388, 1973.
- PAUSE, Bettina M. *et al.* Perspectives on episodic-like and episodic memory. *Frontiers in behavioral neuroscience*, v. 7, p. 33, 2013.
- PAVLIDES, Constantine, and JONATHAN Winson. "Influences of hippocampal place cell firing in the awake state on the activity of these cells during subsequent sleep episodes." *Journal of neuroscience*, 9.8: 2907-2918, 1989.
- PEARLMAN, Chester A. Effect of rapid eye movement (dreaming) sleep deprivation on retention of avoidance learning in rats. US Naval Submarine Medical Center, Bureau of Medicine and Surgery, Navy Department, 1969.
- PEIGNEUX, P.; LAUREYS, S.; DELBEUCK, X.; MAQUET, P. Sleeping brain, learning brain. The role of sleep for memory systems. *Neuroreport*, 12(18):A111-24, 2001.
- PENFIELD, W. Some mechanisms of consciousness discovered during electrical stimulation of the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(2):51-66, 1958.
- PITTS, M. W. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *Bio Protoc.*, 8(5):e2744, 2018.
- POPA, D.; DUVARCI, S.; POPESCU, A. T.; LÉNA, C. & PARÉ, D. Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 107, 6516–6519, 2010.
- RASCH, Björn; BORN, Jan. Maintaining memories by reactivation. *Current opinion in neurobiology*, v. 17, n. 6, p. 698-703, 2007.
- RASCH, Björn; BORN, Jan. About sleep's role in memory. *Physiological reviews*, 2013.
- REGO, I.M.G. Efeitos da cocaína e da privação de sono sobre oscilações hipocampo-corticais, sono e memória. Tese (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2022
- REGO, D.G. Estudo das relações entre idade, parâmetros cognitivos espaciais e atividade do

- sistema serotoninérgico no hipocampo de ratos. Dissertação de mestrado. - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014.
- REINER, Miriam; ROZENGURT, Roman; BARNEA, Anat. Better than sleep: theta neuro-feedback training accelerates memory consolidation. *Biological psychology*, v. 95, p. 45-53, 2014.
- REYNOLDS, Douglas. Gaussian Mixture Models. *Encyclopedia of Biometrics*, n. 2, p. 827–832, 2009. RIBEIRO S.. O oráculo da noite: a história e a ciência do sonho. São Paulo: Companhia das Letras, 2019.
- SACK, Robert L. *et al.* Circadian rhythm sleep disorders: part I, basic principles, shift work and jet lag disorders. *Sleep*, v. 30, n. 11, p. 1460-1483, 2007.
- SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v. 20 (1), p. 11-21, 1957.
- SEIBT, Julie; FRANK, Marcos G. Primed to sleep: the dynamics of synaptic plasticity across brain states. *Frontiers in systems neuroscience*, v. 13, p. 2, 2019.
- SHEA, J.; MOCHIZUKI, T.; SAGVAAG, V.; ASPEVIK, T.; BJORKUM, A. & DATTA, S. Rapid eye movement (REM) sleep homeostatic regulatory processes in the rat: changes in the sleep–wake stages and electroencephalographic power spectra. *Brain Res.*, 1213, 48–56, 2008.
- SIAPAS, Athanassios G.; LUBENOV, Evgueniy V.; WILSON, Matthew A. Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron*, v. 46, n. 1, p. 141-151, 2005.
- SINGER, Annabelle C.; FRANK, Loren M. Rewarded outcomes enhance reactivation of experience in the hippocampus. *Neuron*, v. 64, n. 6, p. 910-921, 2009.
- SIEGLE, J. H.; LÓPEZ, A. C.; PATEL, Y. A.; ABRAMOV, K.; OHAYON, S. & VOIGTS, J. Open Ephys: an open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology. *Journal of neural engineering*, 14(4), 045003, 2017.
- SIEGLE, Joshua H.; WILSON, Matthew A. Enhancement of encoding and retrieval functions through theta phase-specific manipulation of hippocampus. *eLife*, v. 3, p.e03061, 2014.
- SIEGEL, Markus; DONNER, Tobias H.; ENGEL, Andreas K. Spectral fingerprints of large-scale neuronal interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, 2012.
- SMITH, C. & BUTLER, S. Paradoxical sleep at selective times following training is necessary for learning. *Physiol. Behav.*, 29, 469–473, 1982.
- SMITH, C. & ROSE, G.M. Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiol. Behav.*, 59, 93–97, 1996.

- SMITH, Carlyle. Sleep states, memory processes and synaptic plasticity. *Behavioural brain research*, v. 78, n. 1, p. 49-56, 1996.
- SOLTANI ZANGBAR, H. *et al.* Theta oscillations through hippocampal/prefrontal pathway: importance in cognitive performances. *Brain Connectivity*, v. 10, n. 4, p. 157-169, 2020.
- SOUSA, B. M.; DE OLIVEIRA, E.F.; BERALDO, I. J. D. S.; POLANCZYK, R. S.; LEITE, J. P. & LOPES AGUIAR, C. An open-source, ready-to-use and validated ripple detector plugin for the Open Ephys GUI. *J Neural Eng.*, 19(4), 2022.
- TAKASHIMA, Atsuko *et al.* Shift from hippocampal to neocortical centered retrieval network with consolidation. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 32, p. 10087-10093, 2009.
- TARTAR, J. L., WARD, C. P., MCKENNA, J. T., THAKKAR, M., ARRIGONI, E., MCCARLEY, R. W., STRECKER, R. E. Hippocampal synaptic plasticity and spatial learning are impaired in a rat model of sleep fragmentation. *European Journal of Neuroscience*, 23(10), 2739–2748, 2006.
- TAVARES, Lucas CS; TORT, Adriano BL. Hippocampal–prefrontal interactions during spatial decision-making. *Hippocampus*, v. 32, n. 1, p. 38-54, 2022.
- TAXIDIS J, ANASTASSIOU CA, DIBA K e KOCH C Local field potentials encode place cell ensemble activation during hippocampal sharp wave ripples. *Neuron* 87 p. 590–604 2015
- TODOROVA, Ralitsa; ZUGARO, Michaël. Isolated cortical computations during delta waves support memory consolidation. *Science*, v. 366, n. 6463, p. 377-381, 2019.
- TONONI, G. & CIRELLI, C. Sleep and synaptic down-selection. *Eur J Neurosci.*, 51(1):413-421, 2020. Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron.*, 81(1):12-34, 2014.
- VYAZOVSKIY VV, TOBLER I. The Temporal Structure of Behaviour and Sleep Homeostasis. *PLoS ONE* 7(12): e50677, 2012.
- VON BERNHARDI, Rommy; EUGENÍN-VON BERNHARDI, Laura; EUGENÍN, Jaime. What is neural plasticity?. *The plastic brain*, p. 1-15, 2017.
- WETZEL, W., WAGNER, T. and BALSCHUN, D. REM sleep enhancement induced by different procedures improves memory retention in rats. *European Journal of Neuroscience*, 18: 2611-2617, 2003.
- WINSON, Jonathan. "Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat." *Science* 201.4351: 160-163, 1978. <https://www.overleaf.com/project/65b14a3b21b4ccd2dbedb3df>