

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

Ikaró Jesus da Silva Beraldo

**Explorando a corticalização das memórias: marcadores eletrofisiológicos da  
consolidação da memória na tarefa do Labirinto de Barnes**

Belo Horizonte - MG  
2024

IKARO JESUS DA SILVA BERALDO

Explorando a corticalização das memórias: marcadores eletrofisiológicos da  
consolidação da memória na tarefa do Labirinto de Barnes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia e Farmacologia da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
parte das exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas - Fisiologia  
Área de Concentração: Neurociências  
Orientador: Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar

Belo Horizonte - MG  
2024

043

Beraldo, Ikaró Jesus da Silva.

Explorando a corticalização das memórias: marcadores eletrofisiológicos da consolidação da memória na tarefa do Labirinto de Barnes [manuscrito] / Ikaró Jesus da Silva Beraldo. – 2024.

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

Orientador: Prof. Dr. 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. Hipocampo. 3. Córtex Pré-Frontal. 4. Aprendizagem em Labirinto. 5. Sono. 6. Consolidação da Memória. I. Aguiar, Cleiton Lopes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 589 DE IKARO JESUS DA SILVA BERALDO

Às 11:30 horas do dia 29 do mês de maio de 2024, Transmitida através da Plataforma Meet Google, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Ikaro Jesus da Silva Beraldo**. 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. Cleiton Lopes Aguiar**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Vitor Lopes dos Santos**, MRC BNDU, University of Oxford e **Profa. Dra. Ingrid de Miranda Esteves**, University of Lethbridge. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**EXPLORANDO A CORTICALIZAÇÃO DAS MEMÓRIAS: MARCADORES ELETROFISIOLÓGICOS DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA NA TAREFA DO LABIRINTO DE BARNES**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 29 de maio de 2024.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Ingrid de Miranda Esteves, Usuário Externo**, em 15/06/2024, às 22:37, 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 **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 17/06/2024, às 08:48, 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 **Vitor Lopes dos Santos, Usuário Externo**, em 17/06/2024, às 09:49, 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 **3288008** e o código CRC **7E210918**.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 589 DE IKARO JESUS DA SILVA BERALDO

**"EXPLORANDO A CORTICALIZAÇÃO DAS MEMÓRIAS: MARCADORES ELETROFISIOLÓGICOS DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA NA TAREFA DO LABIRINTO DE BARNES"**

**IKARO JESUS DA SILVA BERALDO**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **29 de maio de 2024**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**PROF. DR. CLEITON LOPES AGUIAR, ORIENTADOR, ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**PROF. DR. VITOR LOPES DOS SANTOS, MRC BNDU, UNIVERSITY OF OXFORD**

**PROFA. DRA. INGRID DE MIRANDA ESTEVES, UNIVERSITY OF LETHBRIDGE**

**Belo Horizonte, 29 de maio de 2024**



Documento assinado eletronicamente por **Ingrid de Miranda Esteves, Usuário Externo**, em 15/06/2024, às 22:36, 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 **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 17/06/2024, às 08:48, 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 **Vitor Lopes dos Santos, Usuário Externo**, em 17/06/2024, às 09:49, 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 **3288013** e o código CRC **C75B61AE**.

*A Ana, Aginaldo, Pedro, Davi e Evelyn*

## **Agradecimentos**

Agradeço ao professor Cleiton pela amizade e orientação ao longo dos vários anos. A sua dedicação como mentor foi fundamental para a minha formação como um cientista ético e responsável.

Agradeço também aos amigos e colegas do LANEK. Em especial, à Rafa, que teve participação ativa na concepção e nos experimentos deste trabalho. Ao Igor, Rafa, Mateus, Bruno, Naty, Clara, Beatriz e Muiara, pelas conversas, discussões e aprendizados. À Bia, Anna, Victória, Iasmin, Clara e Isabela pela oportunidade de aprender e poder ensinar. A Renan e Francisco, grandes amigos, companheiros no estudo das neurociências e parte essencial no meu crescimento pessoal e como cientista.

Agradeço à Evelyn pela companhia e amor. Em especial, pela paciência em me ouvir falar sobre coisas inventadas, como campos elétricos e oscilações cerebrais.

Agradeço aos meus pais, que me incentivaram a estudar e me proporcionaram essa oportunidade. Sou grato pelos sacrifícios feitos para que eu pudesse chegar onde cheguei. Aos meus irmãos, que me apoiam e me motivam a continuar.

Agradeço ao garoto do interior de Minas que era curioso demais para se contentar com o que já era sabido e que decidiu que o caminho era descobrir o que ninguém mais sabia.



## Resumo

A comunicação entre o hipocampo e regiões neocorticais associativas é indispensável ao processo de consolidação de memórias declarativas durante o sono. Em especial, sabe-se que a comunicação entre o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (mPFC) é extremamente importante para os processos de consolidação de memórias relativas a objetivos espaciais. Em especial, a tarefa do Labirinto de Barnes (BM), com múltiplas sessões de aquisição, permite que a atividade individual destas regiões, bem como a sua atividade conjunta, seja avaliada durante o sono subsequente ao aprendizado ao longo de diversos dias de aprendizado. Contudo, o conhecimento acerca dos marcadores eletrofisiológicos da consolidação de memória dependente da comunicação hipocampo-mPFC durante o sono ainda é limitado. Portanto, este trabalho pretende investigar o papel da comunicação entre hipocampo e o mPFC durante o sono na consolidação da memória referente ao aprendizado no BM e os marcadores eletrofisiológicos que evidenciam este processo. Portanto, para cumprir este objetivo, ratos Wistar machos tiveram eletrodos de registro implantados em CA1 e no mPFC. Posteriormente, estes animais passaram pelo protocolo de aquisição da tarefa do Labirinto de Barnes ao longo de 4 dias e o protocolo de teste no quinto dia. Além disso, o potencial de campo local (LFP) de CA1 e mPFC foi registrado durante o sono subsequente ao aprendizado. O *DeepLabCut*, *software* de código aberto para a estimativa de pose de animais por meio de redes neurais profundas, foi utilizado para rastrear partes relevantes do corpo do animal e do labirinto *frame-a-frame*. Posteriormente, um conjunto de rotinas em *Python* foi utilizado para extrair os parâmetros comportamentais mais relevantes de cada sessão de aquisição e teste no BM. Além disso, a partir dos registros de LFP, avaliou-se o efeito do aprendizado no BM sobre (1) a arquitetura do sono; (2) atividade oscilatória de CA1 e mPFC; (3) sincronia entre CA1 e o mPFC; (4) interação entre os distintos ritmos hipocampais; (5) ocorrência das SWRs hipocampais, ondas Delta e Spindles do mPFC durante o sono. Ademais, o desempenho dos animais foi correlacionado com a variação dos parâmetros avaliados no sono do primeiro dia de aquisição em comparação com o registro de linha de base. Os animais aprenderam a tarefa e consolidaram de forma eficaz a memória do local de escape do BM, como evidenciado pelo aumento do uso da estratégia direta ao longo dos dias de aquisição e também pelo maior tempo despendido no quadrante alvo do labirinto no dia do teste. Os

registros de LFP mostraram que o aprendizado no BM gera mudanças profundas nas redes hipocampais e neocorticais. Foram observadas mudanças pontuais na arquitetura do sono, como aumento no número de *bouts* do estado acordado no primeiro dia de aquisição e aumento no tempo despendido em sono NREM e REM a partir da segunda hora de registro apenas nos dias de aquisição no BM. Além disso, foram observadas mudanças significativas nas características espectrais do sinal, com o aumento da potência média da banda Delta em CA1 e no mPFC nos dias de aquisição no BM, bem como uma queda gradual ao longo das horas de registro. Não foram observadas alterações na coerência de fase ou coerência espectral entre CA1 e mPFC durante o sono. Porém, o processo de aprendizado produziu alterações nas redes hipocampais e neocorticais, aumentando não só a ocorrência de ondas Delta no mPFC e SWRs hipocampais, mas a ocorrência conjunta destes eventos. Por fim, foi observado um aumento no acoplamento entre a fase das oscilações Delta e a amplitude de oscilações de alta frequência (90-140 Hz) durante o sono NREM nos dias de aquisição no BM. Em especial, foi demonstrado que a atividade de ondas lentas, a duração das SWRs, a ocorrência de ondas Delta, Spindles e ondas Delta acopladas a SWRs podem ser possíveis marcadores eletrofisiológicos da consolidação inicial de memórias relativas ao aprendizado no BM. Portanto, este trabalho corrobora a relevância das SWRs, Spindles e ondas Delta em processos relevantes à consolidação de memórias e também fornece novas evidências sobre as alterações regionais e sobre a comunicação entre as regiões CA1 e o mPFC como consequência ao aprendizado no BM.

**Palavras-chave:** corticalização de memórias; labirinto de Barnes; córtex pré-frontal medial; hipocampo; *sharp wave-ripple*.

## Abstract

Communication between the hippocampus and associative neocortical regions is indispensable for the consolidation of declarative memories during sleep. In particular, it is known that communication between the hippocampus and the medial prefrontal cortex (mPFC) is extremely important for the consolidation processes of memories related to spatial goals. Specifically, the Barnes Maze (BM) task, with multiple acquisition sessions, allows the individual activity of these regions as well as their joint activity to be evaluated during sleep following learning over several days. However, knowledge about the electrophysiological markers of hippocampus-mPFC communication-dependent memory consolidation during sleep is still limited. Therefore, this study aims to investigate the role of communication between the hippocampus and mPFC during sleep in the consolidation of memory related to learning in the BM and the electrophysiological markers that evidence this process. To achieve this objective, male Wistar rats had recording electrodes implanted in CA1 and the mPFC. Subsequently, these animals underwent the Barnes Maze task acquisition protocol over 4 days and the test protocol on the fifth day. Additionally, the local field potential (LFP) of CA1 and mPFC was recorded during sleep following learning. *DeepLabCut*, an open-source software for animal pose estimation using deep neural networks, was used to track relevant parts of the animal's body and the maze frame-by-frame. Subsequently, a set of Python routines was used to extract the most relevant behavioral parameters from each acquisition and test session in the BM. Furthermore, from the LFP records, the effect of learning in the BM on (1) sleep architecture; (2) oscillatory activity of CA1 and mPFC; (3) synchrony between CA1 and mPFC; (4) interaction between different hippocampal rhythms; (5) occurrence of hippocampal sharp-wave ripples (SWRs), delta waves, and mPFC spindles during sleep was evaluated. Additionally, the animals' performance was correlated with the variation of the parameters assessed in the sleep of the first acquisition day compared to baseline recording. The animals learned the task and effectively consolidated the memory of the BM escape location, as evidenced by the increased use of the direct strategy over the acquisition days. Also, by the longer time spent in the maze's target quadrant on the test day. LFP records showed that learning in the BM generates profound changes in hippocampal and neocortical networks. Specific changes in sleep architecture were observed, such as an increase in the number of awake *bouts* on the first acquisition

day and an increase in time spent in NREM and REM sleep from the second hour of recording only on the BM acquisition days. Moreover, significant changes in spectral characteristics of the signal were observed, with an increase in the mean power of the delta band in CA1 and mPFC on the BM acquisition days. There was also a gradual decrease over the recording hours. No changes were observed in phase coherence or spectral coherence between CA1 and mPFC during sleep. However, the learning process produced changes in hippocampal and neocortical networks, increasing not only the occurrence of delta waves in the mPFC and hippocampal SWRs, but also the joint occurrence of these events. Finally, an increase in coupling between the phase of delta oscillations and the amplitude of high-frequency oscillations (90-140 Hz) during NREM sleep on the BM acquisition days was observed. In particular, it was demonstrated that slow wave activity, SWR duration, delta wave occurrence, spindles, and delta waves coupled to SWRs may be possible electrophysiological markers of initial memory consolidation related to learning in the BM. Therefore, this study corroborates the relevance of SWRs, spindles, and delta waves in processes relevant to memory consolidation. It also provides new evidence on regional changes and communication between CA1 and mPFC regions as a consequence of learning in the BM.

**Keywords:** memory corticalization; Barnes maze; medial prefrontal cortex; hippocampus; sharp wave-ripple.

## Lista de figuras

Figura 1 - Os traços de memória são armazenados fisicamente como conjuntos de neurônios interconectados.

Figura 2 - Oscilações presentes em cada estado do ciclo sono-vigília.

Figura 3 - Modelo de memória em dois estágios.

Figura 4 - Paradigma experimental.

Figura 5 - Cortes histológicos para definição do posicionamento dos eletrodos de registro

Figura 6 - Análise dos registros de vídeo das sessões no Labirinto de Barnes

Figura 7 - Exemplos representativos de parâmetros comportamentais avaliados durante as sessões de aquisição no BM

Figura 8 - Parâmetros comportamentais avaliados durante as sessões de aquisição no BM

Figura 9 - Estratégia utilizada ao longo dos dias de aquisição e medida da eficiência da consolidação de memória pela sessão de teste

Figura 10 - Características espectrais de cada época do ciclo sono-vigília

Figura 11 - Coerência de fase e espectral entre CA1 e mPFC, acoplamento de frequência cruzada fase-amplitude em CA1 e SWRs-Delta-Spindles

Figura 12 - Características das SWRs, ondas Delta e Spindles

Figura 13 - Tempo despendido em cada um dos estados do ciclo sono-vigília ao longo dos dias de registro

Figura 14 - Número de *bouts* de cada um dos estados do ciclo sono-vigília ao longo dos dias de registro

Figura 15 - Duração dos *bouts* de cada um dos estados do ciclo sono-vigília ao longo dos dias de registro

Figura 16 - Latência para o sono e eficiência do sono ao longo dos dias de registro

Figura 17 - Potência das bandas Delta (NREM) e Teta (REM) no mPFC e CA1 ao longo dos dias de registro

Figura 18 - Correlação entre a potência de Delta e a eficácia da consolidação da memória

Figura 19 - Coerência de fase e coerência espectral entre CA1 e mPFC nas bandas Delta (NREM) e Teta (REM) ao longo dos dias de registro

Figura 20 - Características das SWRs ao longo dos dias de registro

Figura 21 - Fração das SWRs com duração maior que 100 ms e correlação entre as características das SWRs e a eficácia da consolidação da memória

Figura 22 - Características das ondas Delta ao longo dos dias de registro

Figura 23 - Características das Spindles ao longo dos dias de registro

Figura 24 - Ocorrência do acoplamento temporal das SWRs, Delta e Spindles ao longo dos dias de registro

Figura 25 - Ocorrência de SWRs-Delta-Spindle acopladas ao longo dos dias de registro e correlação entre as ondas Delta, Spindle e o acoplamento destes eventos e a eficácia de consolidação da memória

Figura 26 - Acoplamento de frequência cruzada da amplitude de Gama baixa, alta e HFO pela fase de Teta em CA1 durante o registro de linha de base

Figura 27 - Acoplamento de frequência cruzada da amplitude de Gama baixa, alta e HFO pela fase de Delta no sono NREM em CA1 durante o registro de linha de base

Figura 28 - Correlação entre a ocorrência de SWRs e a potência da banda Delta no mPFC e CA1 e a relação temporal entre a queda destes parâmetros nos diferentes dias de registro

Figura 29 - Relação temporal entre a ocorrência de SWRs e a atividade de ondas lentas

Figura S1 - Arquitetura do sono, características espectrais e coerência entre CA1 e mPFC no registro de linha de base

Figura S2 - Acoplamento de frequência cruzada fase-amplitude em CA1 durante o registro de linha de base

Figura S3 - Características das SWRs, Delta e Spindles durante o registro de linha de base

## Lista de abreviaturas

LTP - Potenciação de Longa Duração (Long-term Potentiation)

LTD - Depressão de Longa Duração (Long-term Depression)

REM - Do inglês, "*rapid eye movement*"

NREM - Do inglês, "*non-rapid eye movement*"

SWR - Do inglês, "*sharp-wave ripple*"

SHY - hipótese da homeostase sináptica (do inglês, synaptic homeostasis hypothesis)

mPFC - Córtex pré-frontal medial

PrCm - área pré-central média

ACC - córtex cingulado anterior

PL - córtex pré-límbico

IL - córtex infra-límbico

BM - Barnes Maze

CA1 - cornu Ammonis 1

CA3 - cornu Ammonis 3

ML - meso-lateral

AP - antero-posterior

DV - dorso-ventral

LFP - do inglês, "*local field potential*"

PBS - do inglês "*phosphate-buffered saline*"

PFA - paraformaldeído

TPR - taxa de verdadeiro positivo (do inglês "*true positive rate*")

FPR - taxa de falso positivo (do inglês "*false positive rate*")

MSC - Magnitude Quadrática da Coerência

MI - Índice de Modulação (do inglês "*modulation index*")



sF- sinal referente à fase

RM One-way-ANOVA - ANOVA de uma via de medidas repetidas

RM Two-way-ANOVA - ANOVA de duas vias de medidas repetidas

REML - máxima verossimilhança restrita (do inglês, restricted maximum likelihood)

## Sumário

1. Introdução .....	20
1.1. Memória .....	20
1.2. Sono.....	22
1.3. Papel mnemônico do sono.....	24
1.4. Comunicação entre o hipocampo e córtex pré-frontal medial (mPFC).....	26
1.5. Labirinto de Barnes no estudo da comunicação entre o hipocampo e o mPFC .....	28
1.6. Relevância .....	29
2. Objetivos .....	29
2.1. Objetivos específicos .....	30
3. Métodos.....	30
3.1. Sujeitos experimentais .....	30
3.2. Procedimento cirúrgico .....	31
3.2.1. Anestesia .....	31
3.2.2. Cirurgia estereotáxica e implante de eletrodos .....	31
3.3. Registro eletrofisiológico .....	32
3.4. Tarefa do Labirinto de Barnes.....	32
3.5. Protocolo experimental .....	34
3.6. Lesão eletrolítica, perfusão e fixação do tecido nervoso.....	36
3.7. Histologia .....	36
3.8. Análise dos sinais eletrofisiológicos .....	37
3.8.1. Pré-processamento.....	37
3.8.2. Classificação do ciclo sono vigília.....	39
3.8.3. Arquitetura do sono.....	41
3.8.4 Power Spectral Density (PSD) e Espectrogramas .....	42
3.8.5 Coerência de fase.....	42
3.8.6 Coerência espectral .....	43
3.8.7 Acoplamento de frequência cruzada.....	43
3.8.8 Detecção de SWRs, Delta e Spindles.....	44
3.9. Análise dos registros de vídeo da tarefa do BM.....	45
3.9.1. Pré-processamento dos vídeos .....	45

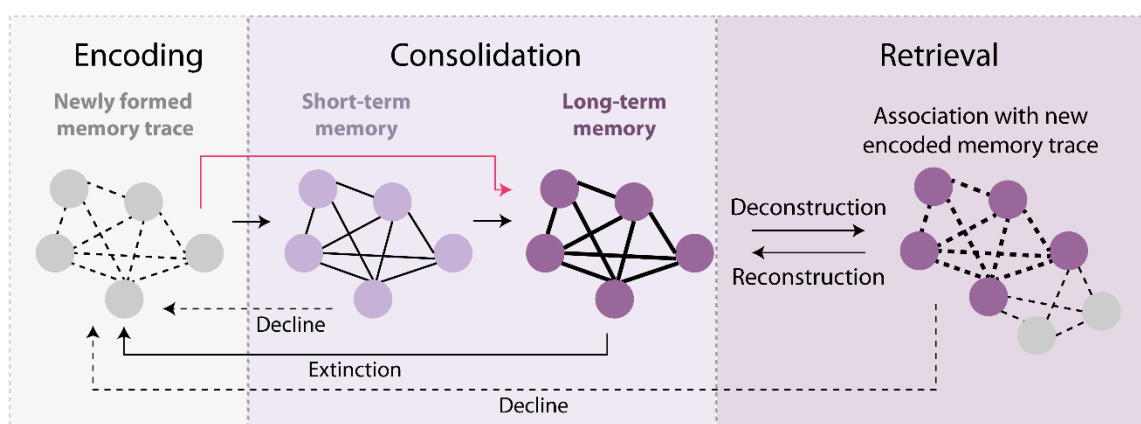
3.9.2. Extração de pose pelo <i>DeepLabCut</i> .....	46
3.9.3. Extração automática dos parâmetros comportamentais .....	46
4 - Resultados .....	47
4.1 - Resultados comportamentos do Labirinto de Barnes .....	47
4.1.1 - Comparação ao longo das sessões no BM .....	47
4.1.2 - Comparação ao longo dos dias de aprendizado no BM .....	50
4.1.3 - Sessão de teste no BM.....	53
4.2 - Caracterização eletrofisiológica do ciclo sono-vigília .....	55
4.3. Comparação entre dias antes e após aprendizado.....	62
4.3.1. Arquitetura do sono.....	62
4.3.2. Densidade espectral de potência (PSD).....	71
4.3.3. Coerência de Fase CA1-mPFC .....	75
4.3.4. Coerência Espectral CA1-mPFC .....	76
4.3.5. Sharp wave-ripples .....	78
4.3.6. Ondas Delta.....	83
4.3.7. Spindle.....	86
4.3.8. Acoplamento de SWRs, ondas Delta e Spindles .....	89
4.3.9. Acoplamento de frequência cruzada.....	95
4.3.10. Relação entre SWRs e a atividade de ondas lentas .....	101
5. Discussão.....	104
5.0. Os animais aprendem a tarefa e consolidam a memória eficientemente... 104	
5.1. A arquitetura do sono é alterada em resposta ao aprendizado .....	105
5.2. A atividade de ondas lentas é um possível marcador do processo de consolidação de memórias durante o sono NREM.....	106
5.3. A atividade de Theta em REM parece não estar associada à consolidação de memória na tarefa do BM .....	108
5.4. SWRs são marcadores eletrofisiológicos do processo de consolidação de memória no BM .....	110
5.5. Ondas Delta e Spindles no mPFC são marcadores do processo de consolidação do aprendizado no BM.....	112
5.6. A comunicação CA1-mPFC durante o sono NREM suporta o processo de consolidação de memórias no BM.....	113
5.7. SWRs parecem ser reguladas homeostaticamente de forma semelhante à atividade de ondas lentas no sono NREM .....	114
6. Conclusões.....	118
7. Próximos passos .....	118
8. Material suplementar .....	119

8.1. Caracterização do registro de linha de base (BL) .....	120
8.1.1. Arquitetura do sono.....	120
8.1.2. Densidade espectral de potência (PSD) .....	120
8.1.3. Coerência de Fase entre CA1 e o mPFC .....	121
8.1.4. Coerência Espectral.....	121
8.1.5. Acoplamento de frequência cruzada.....	124
8.1.6. Eventos oscilatórios relevantes a processos mnemônicos .....	126
9. Referências .....	128

## 1. Introdução

### 1.1. Memória

A memória é um domínio crítico do funcionamento cognitivo. Ela permite que experiências passadas sejam utilizadas de forma adaptativa, garantindo a sobrevivência dos seres vivos (Rasch e Born, 2013). Contudo, o enigma de como memórias são formadas e armazenadas fisicamente no sistema nervoso impulsiona a pesquisa sobre a neurofisiologia da memória até os dias atuais. Na primeira metade do século 20, Richard Semon postulou a teoria do engrama (Semon, 1921 e 1923), que posteriormente foi refinada por Karl Lashley e Donald Hebb (Franz e Lashley, 1917; Lashley 1933, 1935; Hebb 1949). Esta teoria diz que processos de aprendizado são dependentes da ativação de grupos específicos de neurônios que terão o papel de representar informações, formando um traço de memória. Nesse sentido, as memórias apresentam três estágios: a codificação, a consolidação e a evocação. A codificação é o processo de representar, como traços de memória, as informações obtidas e interpretadas a partir de estímulos sensoriais. A consolidação é o processo de fortalecimento, estabilização e possível associação de tais traços de memória com outros já existentes. E por fim, a evocação é o processo de reativar o traço de memória para recuperação de determinada informação (**Figura 1**).



**Figura 1. Os traços de memória são armazenados fisicamente como conjuntos de neurônios interconectados.** Durante o dia, diversas informações são adquiridas e novos traços de memória são formados através da plasticidade sináptica. O aumento da concentração de cálcio neste grupo de neurônios aciona mecanismos responsáveis por manter sua atividade coesa durante esta primeira fase. Dentro de algumas horas, a transcrição gênica, a síntese de proteínas e as alterações morfológicas

necessárias para a memória de longo prazo são iniciadas. Quando essas informações armazenadas são evocadas (consciente ou inconscientemente), esses traços de memória são reativados e tornam-se suscetíveis a modificações. As esferas representam neurônios e as linhas que os conectam representam as conexões sinápticas entre essas células. As linhas tracejadas representam conexões lábeis enquanto as linhas espessas indicam conexões estáveis. As setas tracejadas representam o enfraquecimento dos traços de memória com o passar do tempo, enquanto as setas contínuas representam a relação serial entre os estágios da memória. A seta vermelha representa processos de consolidação da memória de longo prazo que ocorrem paralelamente independentemente dos processos de consolidação de curto prazo. Adaptado de Beraldo et al. (2024).

A teoria do engrama postulou que a formação de traços de memória é dependente de mudanças químicas e físicas nas conexões sinápticas e modulam a capacidade de um neurônio ser excitado ou excitar outros neurônios (Franz e Lashley, 1917; Lashley 1933, 1935; Hebb 1949; Josselyn et al. 2015; Tonegawa et al. 2018). Dessa forma, originou-se o conceito de plasticidade sináptica, definido como a modificação da força ou eficácia sináptica dependentemente da atividade neural, sendo considerada um dos principais mecanismos de formação de memória ao nível neuronal (Citri e Malenka, 2008; Rasch e Born, 2013, Tonegawa et al. 2018). Nesse caso, a formação de representações neurais é dependente de mecanismos de plasticidade sináptica de curta e longa duração. Em especial, os mecanismos promotores de plasticidade de longa duração: a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) (Bliss and Lømo, 1973) e a depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*) (Ito e Kano, 1982; Dudek e Bear, 1992; Bear e Malenka, 1994) parecem ser imprescindíveis para a consolidação de memórias. Estes mecanismos fazem com que os neurônios envolvidos na representação de um traço de memória consolidem essa informação, fortalecendo as representações neurais relevantes e enfraquecendo conexões que geram ruído nas redes neurais (Dudai, 2004). Nesse sentido, os diversos tipos de memória, como memória de trabalho, memórias procedurais ou declarativas são sistemas emergentes que surgem a partir dos mecanismos físicos de modulação da plasticidade sináptica e da complexa comunicação entre regiões do sistema nervoso central (Postle, 2006; McClelland, 2010).

Memórias declarativas abrangem informações acerca de conhecimento factual e eventos que podem ser evocados conscientemente. Contudo, a pesquisa acerca deste tipo de memória foi alavancada apenas em 1957 com um dos casos clínicos mais famosos das neurociências: Brenda Milner e William Scoville descreveram as

consequências da remoção bilateral do lobo temporal medial do paciente H.M. (Scoville e Milner, 1957). Curiosamente, este paciente desenvolveu um quadro de amnésia anterógrada, sendo as memórias declarativas especialmente afetadas. A partir deste caso, constatou-se que a formação de novas memórias declarativas é altamente dependente da atividade do hipocampo, uma região do lobo temporal de mamíferos, mas que memórias antigas são menos afetadas pela remoção desta região.

Algum tempo depois, na década de 1980, uma nova hipótese apresentava explicações para as observações obtidas a partir do caso do paciente H.M. O modelo da formação de memória em dois estágios (Buzsáki, 1989) indica que memórias declarativas são inicialmente codificadas mediante associação entre a atividade de córtices associativos e o hipocampo. Desta forma, o hipocampo armazena temporariamente a informação, e posteriormente os traços de memória hipocampais são reativados e, seletivamente, fortalecem representações neurais neocorticais. Consequentemente, com o passar do tempo, regiões neocorticais associativas passam a manter a memória a longo prazo, processo reconhecido como corticalização de memórias (Rasch e Born, 2013, Almeida-Filho et al. 2018). Nesse sentido, sabe-se, por exemplo, que a formação de representações neocorticais de localizações espaciais é dependente da integridade hipocampal (Esteves et al. 2021, 2023). Por fim, por ser robusta e ter um corpo fundamental de evidências que a suportam, esta é a hipótese mais aceita para explicar o processo de formação de memórias declarativas.

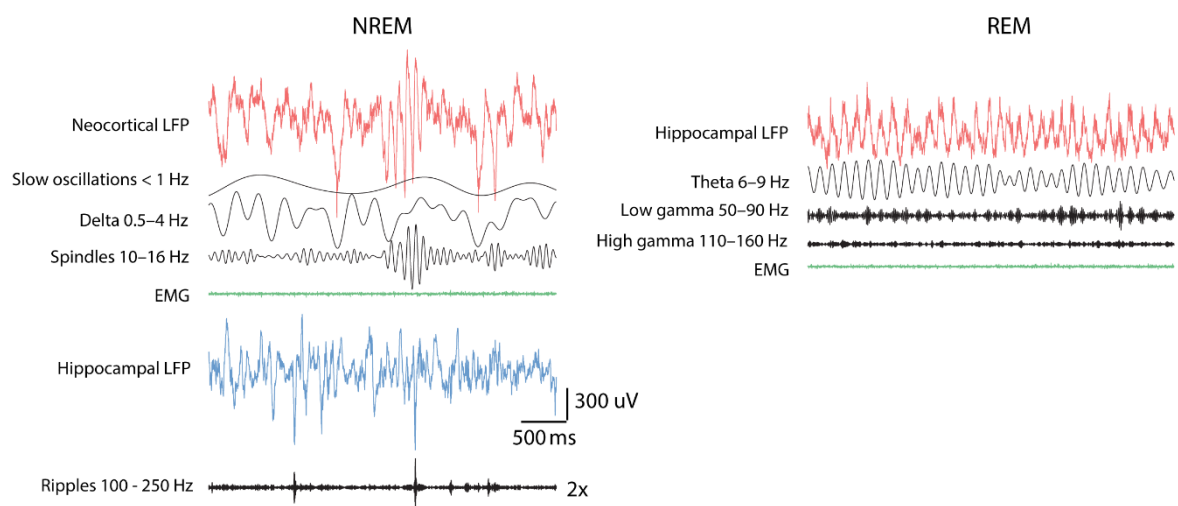
Contudo, uma parte importante desta hipótese é que o sono tem papel imprescindível para a consolidação de traços de memória (Buzsaki, 1989; Rasch e Born, 2013; Girardeau e Lopes-Dos-Santos, 2021). Nesse caso, o sono é a janela de oportunidade para a transferência dessas informações por meio da seleção das representações hipocampais e fortalecimento das representações neocorticais da memória (Rasch e Born, 2013; Almeida-Filho et al. 2018; Yang et al. 2024).

## **1.2. Sono**

O sono é um processo fisiológico caracterizado pela alteração no nível de consciência, redução da atividade muscular e da resposta a estímulos sensoriais (Borbély, 1982). Além disso, o sono é um evento cíclico, rapidamente reversível e

homeostaticamente regulado (Borbély, 1982). Em mamíferos, o sono é dividido em dois estados distintos, o sono REM (do inglês, rapid eye movement) e o estado complementar, o sono NREM. Estes estados diferem por características fisiológicas autonômicas, mas principalmente pelo padrão de atividade oscilatória do cérebro. Partindo de registros de potencial de campo local (LFP), durante o sono NREM, há uma prevalência de oscilações lentas ( $< 1$  Hz), ondas delta (0.5 - 4 Hz) e *Spindles* (10 - 16 Hz) em regiões neocorticais e *sharp wave-ripples* (SWRs) no hipocampo (100 - 250 Hz) (Adamantidis, 2019). Como descrito por Steriade, Nuñez e Amzica (1993), as oscilações lentas são geradas por variações no potencial de repouso da membrana de células talâmicas e corticais. Já as ondas Delta e *Spindles* são geradas a partir de osciladores intrínsecos do tálamo com projeções para neocórtex. (Adamantidis, 2019) (**Figura 2**). As SWRs hipocámpais são geradas a partir da atividade espontânea da rede recorrente de neurônios piramidais da região CA3, produzindo uma atividade síncrona de excitação e inibição por interneurônios, dando origem à variação em alta frequência no potencial de campo (Schlingloff et al., 2014).

Durante o sono REM, há uma prevalência das oscilações Teta (5 - 9 Hz) e Gama (30-90 Hz). As oscilações Teta no cérebro de mamíferos tem origem no hipocampo (Lubenov e Siapas, 2009) e são dependentes da atividade do septo medial, visto que ele orchestra o ritmo hipocámpal por meio de células gabaérgicas que disparam na mesma frequência e de forma sincronizada com a fase de Teta (Colgin, 2016). Oscilações Gama, por sua vez, são geradas a partir de osciladores locais com sincronia de excitação e inibição em diversas áreas do cérebro, como o neocórtex e hipocampo (Buzsáki e Wang, 2012) (**Figura 2**).





**Figura 2. Oscilações presentes em cada estado do ciclo sono-vigília.** Durante o sono NREM tem-se um aumento de amplitude para as oscilações lentas, Delta e para faixa de *Spindles* em registros neocorticais. No hipocampo, há maior atividade na faixa de Ripples (100-250 Hz). O EMG apresenta baixa amplitude, indicando baixa atividade muscular. Para o sono REM, há um aumento de amplitude para as oscilações Teta e Gama. Assim como no sono NREM, o EMG também apresenta baixa amplitude. Adaptado de Adamantidis (2019).

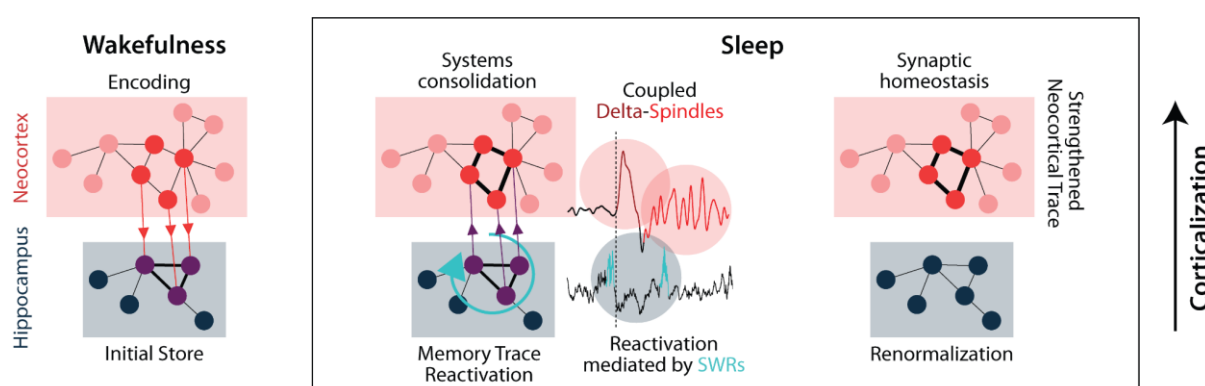
Existem diversas evidências que associam os padrões de atividade oscilatória durante o sono com processos de consolidação de memória (Girardeau et al., 2009, 2014; Maingret et al., 2016, Boyce et al., 2016; Sadowski et al., 2016). Em especial, estes eventos oscilatórios estão relacionados à promoção de plasticidade sináptica e à seleção e reativação de grupos neurais que representam memórias relevantes ao indivíduo (Sadowski et al., 2016; Norimoto et al., 2018; Todorova e Zugaro, 2019).

### 1.3. Papel mnemônico do sono

O sono apresenta um papel ativo no processo de consolidação de memórias. Dentre os mecanismos propostos para explicar a função mnemônica do sono tem-se a hipótese da homeostase sináptica durante o sono (SHY) proposta por Tononi e Cirelli (Tononi e Cirelli, 2003, 2006 e 2014; Cirelli e Tononi, 2021). Esta hipótese considera que o estado acordado promove potenciação sináptica nas redes corticais (Vyazovskiy et al., 2008; Liu et al., 2010) e que a atividade de ondas lentas durante o sono NREM está ligada à renormalização global da força sináptica (Siddoway et al., 2014; González-Rueda et al., 2018). Além disso, a renormalização dos pesos sinápticos durante o sono de ondas lentas é essencial ao aprendizado uma vez que as representações neurais de informações relevantes são mantidas em detrimento de conexões sinápticas de menor importância (Markram e Tsodyks, 1996; Olcese et al., 2010; Hashmi et al., 2013; Cirelli e Tononi, 2021). Dessa forma, o sono NREM tem o papel de reduzir o ruído nas redes neocorticais e favorecer a consolidação de traços de memória importantes.

De forma complementar, o modelo de formação de memórias em dois estágios (Buzsaki, 1989) engloba múltiplas hipóteses para tentar explicar o papel de cada uma das fases do sono na consolidação de memórias. Em suma, (1) a hipótese do processo duplo defende que diferentes fases do sono são responsáveis pela consolidação de diferentes tipos de memória (Born e Wilhelm, 2012). (2) A hipótese

sequencial descreve que o sono de ondas lentas é responsável por realizar uma triagem de memórias, fortalecendo aquelas que são úteis ao organismo e enfraquecendo as demais. Posteriormente, o sono REM é responsável por integrar as memórias selecionadas às memórias já existentes (Ambrosini e Giuditta, 2001; Almeida-Filho et al. 2018). Por fim, (3) a hipótese da consolidação do sistema ativo (Born e Wilhelm, 2012) integra as duas hipóteses anteriores, mas descreve um papel ativo de ambas as fases do sono no processo de consolidação de memórias. Nesse caso, durante o sono NREM os eventos de SWRs são responsáveis pela reativação de representações neurais hipocampais e de regiões neocorticais associativas ligadas ao hipocampo (Wilson e McNaughton, 1994; Peyrache et al., 2009). Além disso, as ondas Delta e Spindles tálamo-corticais estão associadas à reativação de neurônios que fazem parte de representações neurais neocorticais. Em especial, a atividade neural neocortical durante eventos de ondas Delta e Spindle é modulada pelas SWRs hipocampais (Peyrache et al., 2009; Peyrache et al., 2011; Maingret et al., 2016; Todorova e Zugaro, 2019). Portanto, o acoplamento temporal destes eventos oscilatórios é essencial à triagem de representações neurais hipocampais e pela consolidação das representações neocorticais (Maingret et al., 2016; Todorova e Zugaro, 2019). Posteriormente, o sono REM é responsável por estabilizar as representações de memórias, consolidando as sinapses envolvidas (Rasch e Born, 2013, Almeida-Filho et al. 2018) (**Figura 3**).



**Figura 3. Modelo de memória em dois estágios.** Durante o estado acordado, memórias são codificadas formando traços de memória no hipocampo (armazenamento temporário) e em regiões neocorticais (armazenamento a longo prazo). Durante o sono, as representações neurais hipocampais são reativadas e as representações neocorticais são fortalecidas. O processo de reativação no hipocampo está associado à atividade de SWRs. E a reativação de neurônios neocorticais já foi observada durante eventos de ondas Delta e Spindles. Posteriormente, o peso das conexões sinápticas é renormalizado globalmente (como descrito pela SHY), mantendo a força das sinapses das

representações neocorticais. As setas indicam o sentido do fluxo de informação. A espessura das linhas que conectam os neurônios indica a eficácia das sinapses que fazem a conexão destas células.

Entretanto, apesar de existir um corpo mais robusto de evidências acerca da função do sono NREM, o papel do sono REM na consolidação de memórias declarativas ainda não é bem compreendido (Almeida-Filho et al. 2018; Girardeau e Lopes-Dos-Santos, 2021). Sabe-se que o tempo despendido em sono REM é maior após a exposição de roedores a ambientes novos e após o treino em tarefas procedurais (Smith, 1996; Smith et al., 2004). Além disso, existem processos de plasticidade sináptica ocorrendo em regiões neocorticais durante o sono REM em resposta à indução de LTP no hipocampo durante o estado acordado (Ribeiro et al., 2002). Ainda, a inibição da atividade de oscilações Teta durante o sono REM prejudica a consolidação da memória de reconhecimento de localização de objetos (Boyce et al., 2016). Por fim, a atividade de oscilações Teta durante o REM é importante para a consolidação de memórias contextuais aversivas (Popa et al., 2010; Boyce et al., 2016). Portanto, embora pequeno, há um conjunto de evidências que indicam que o sono REM e a atividade oscilatória de Teta podem estar relacionados ao processo de corticalização de memórias declarativas (Almeida-Filho, 2018; Girardeau e Lopes-dos-Santos, 2021).

Por fim, para além do fator temporal, o processo de corticalização é dependente do fator espacial, ou seja, da comunicação do hipocampo com regiões neocorticais específicas. Nesse contexto, há evidências de que os engramas que representam uma mesma memória são distribuídos por diversas regiões do cérebro, porém, regiões específicas armazenam traços de memória mais relevantes (Roy et al. 2022). Dentre as regiões corticais associativas, o córtex pré-frontal parece ser uma importante região para a consolidação de memórias declarativas a longo prazo (Euston et al., 2012). Em especial, a comunicação entre o córtex pré-frontal medial (mPFC) e o hipocampo é importante para a codificação de memórias durante o estado acordado e para a consolidação de memórias declarativas durante o sono (Euston et al., 2012; Maingret et al., 2016; Binder et al., 2019).

#### **1.4. Comunicação entre o hipocampo e córtex pré-frontal medial (mPFC)**

O mPFC é uma região neocortical associativa do cérebro de mamíferos, sendo formada pelas sub-regiões anatômicas: área pré-central medial (PrCm), córtex cingulado anterior (ACC), córtex pré-límbico (PL) e córtex infra-límbico (IL) (Xu et al., 2019). Dentre as conexões com outras regiões do cérebro destacam-se as projeções monossinápticas glutamatérgicas que partem do hipocampo ventral (Jay, Glowinski e Thierry, 1989; Jay, Witter, 1991). Nesse contexto, a comunicação entre o hipocampo e o mPFC é essencial para vários processos cognitivos. Por exemplo, a sincronia entre estas duas regiões é extremamente importante para a execução de tarefas que envolvam a tomada de decisões (Jones e Wilson, 2005; Benchenane et al., 2010; Sigurdsson et al., 2010; O'Neill et al., 2013; Schmidt et al., 2021; Tavares e Tort, 2022).

Além disso, a comunicação entre estas regiões é importante para a consolidação de memórias durante o sono (Popa et al., 2010, Peyrache et al., 2011; Maingret et al., 2016; Wang e Ikemoto, 2016; Tang et al., 2019; Todorova e Zugaro, 2019; Binder et al., 2019). Em especial, a comunicação entre o hipocampo e o mPFC apresenta uma maior sincronia durante o sono NREM. Ainda, Peyrache et al. (2011) mostraram que as células piramidais do mPFC são ativadas de forma síncrona à fase das SWRs hipocámpais durante o sono NREM. De forma complementar, Wang e Ikemoto (2016) demonstraram que neurônios do ACC apresentaram um aumento de atividade logo antes de eventos de SWRs hipocámpais e 17% destes neurônios apresentaram um aumento de atividade após a ocorrência destes eventos. Além disso, Maingret et al. (2016) reforçaram o acoplamento entre as SWRs hipocámpais, ondas Delta e Spindles corticais por estimulação elétrica durante o sono NREM subsequente a um aprendizado espacial. Consequentemente, os animais apresentaram maior desempenho na evocação da memória e uma maior responsividade do mPFC à tarefa. Por fim, Todorova e Zugaro (2019) mostraram que durante o sono NREM, células do mPFC envolvidas no aprendizado de uma memória espacial são preferencialmente ativadas durante ondas Delta em resposta a eventos de SWRs hipocámpais. Em conjunto, estes resultados evidenciam a elevada responsividade da rede do mPFC à atividade hipocámpal. Sobretudo, a reativação de neurônios do mPFC em resposta às SWRs hipocámpais pode ser um indicador de processos plásticos essenciais à consolidação de memórias durante o sono NREM.

Em suma, para se estudar processos mnemônicos utiliza-se tarefas comportamentais que exigem a formação de memórias. Nesse caso, considerando as funções do hipocampo na representação espacial e do mPFC no processo de tomada

de decisões, a tarefa do Labirinto de Barnes (BM) (Barnes, 1979) é um paradigma adequado para o estudo da comunicação entre o hipocampo e o mPFC e sua função na consolidação de memórias (Holschneider et al., 2019).

### **1.5. Labirinto de Barnes no estudo da comunicação entre o hipocampo e o mPFC**

A tarefa do BM é um teste comportamental que utiliza um contexto aversivo para motivar o animal a encontrar um local de escape seguro. É uma tarefa que exige a formação de uma memória espacial relativa à localização do escape e à tomada de decisão efetiva (Barnes, 1979; Pitts, 2018). Estudos de ativação funcional do cérebro revelaram que a evocação da memória espacial no BM está relacionada a uma ativação das regiões CA1 e CA3 do hipocampo e do córtex pré-límbico do mPFC, evidenciando a importância destas regiões em processos de evocação, e potencialmente, de consolidação de memórias (Holschneider et al., 2019). Além disso, Binder et al. (2019) mostraram que o bloqueio das projeções do hipocampo ventral para o mPFC durante o sono NREM prejudicou a consolidação de uma memória recente e impediu o desenvolvimento de uma estratégia que utiliza informações espaciais na tarefa do BM. De forma complementar, sabe-se que a estimulação elétrica do mPFC prejudica o aprendizado observacional na tarefa do BM (Yamada e Sakurai, 2022). Neste trabalho, ratos que observavam a execução da tarefa do BM por outros animais eram estimulados eletricamente no mPFC quando estes atingiam o escape. Ainda, em camundongos modelo de encefalopatia associada à sépsis com prejuízo em memória espacial, a estimulação da projeção monossináptica entre o hipocampo ventral e o mPFC melhorou o desempenho dos animais na tarefa do BM (Ge et al., 2023). Por fim, durante a execução da tarefa do BM, há um aumento progressivo na coerência entre CA1 e mPFC na faixa de Gama baixa (20–40 Hz) ao longo dos dias de aquisição da tarefa (Negrón-Oyarzo et al., 2018). Contudo, o mais importante é que os autores encontraram neurônios do mPFC com disparos em fases específicas de Teta e Gama baixa de CA1 durante a execução da tarefa. Em especial, sessões executadas com uma estratégia que demanda a formação de memória espacial aloccêntrica apresentavam uma maior taxa de disparo destas células durante o período de navegação pelo labirinto (Negrón-Oyarzo et al., 2018).

Em conjunto, estes resultados demonstram um aumento na conectividade funcional entre o mPFC e o hipocampo durante a aquisição da tarefa do BM, indicando a relevância da comunicação mPFC-hipocampo para a consolidação de memórias relativas a objetivos espaciais. Entretanto, o conhecimento acerca dos marcadores eletrofisiológicos da consolidação de memória dependente da comunicação hipocampo-mPFC durante o sono ainda é limitado. Em especial, a tarefa do BM, com múltiplas sessões de aquisição, permite avaliar a atividade individual destas regiões, bem como a sua atividade conjunta durante o sono ao longo de diversos dias de aprendizado.

## **1.6. Relevância**

Seres humanos passam um terço de suas vidas dormindo, o que é uma evidência da importância do sono para a espécie humana. Contudo, atualmente o sono é sistematicamente negligenciado, gerando consequências crônicas ao bem-estar dos indivíduos (Sorscher, 2008). Distúrbios psiquiátricos como depressão e ansiedade e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer apresentam intensos efeitos negativos sobre a qualidade de sono do indivíduo e, portanto, faz-se necessário entender o papel do sono em processos cognitivos (Nutt et al., 2008, Anghel et al., 2023). Em especial, a função do sono no processo de consolidação de memórias é pouco compreendida.

Dessa forma, elucidar os mecanismos de consolidação de memória durante o período de sono produz mais evidências acerca da importância deste estado comportamental. Isto é essencial para moldar práticas médicas, políticas educacionais e as relações laborais atuais. Portanto, este trabalho visa produzir conhecimento científico básico de neurofisiologia do sono e memória com objetivo de entender: 1) como o aprendizado modifica o padrão de atividade do hipocampo e mPFC durante o sono; 2) como a atividade isolada e conjunta do hipocampo e mPFC atuam no processo de consolidação de memórias durante o sono; 3) quais os possíveis marcadores eletrofisiológicos da consolidação de memórias relativas à tarefa do BM durante o sono.

## **2. Objetivos**

Este trabalho tem como objetivo investigar o papel da comunicação entre hipocampo e córtex pré-frontal medial durante o sono para a consolidação da memória no Labirinto de Barnes e os marcadores eletrofisiológicos que evidenciam este processo.

## 2.1. Objetivos específicos

Em experimentos com ratos Wistar, realizando o registro do potencial de campo local de CA1 e mPFC pretendemos avaliar o efeito da aquisição da tarefa do BM sobre:

- a arquitetura do sono dos animais;
- a atividade oscilatória de CA1 e do mPFC durante o sono;
- a sincronia entre CA1 e o mPFC durante o sono;
- a interação entre os ritmos hipocampais de frequência distintas durante o sono;
- a ocorrência e as características das SWRs hipocampais, ondas Delta e Spindles do mPFC, bem como o acoplamento temporal entre estes eventos;

Além disso, pretendemos correlacionar os parâmetros eletrofisiológicos avaliados com o desempenho dos animais no teste do BM.

## 3. Métodos

### 3.1. Sujeitos experimentais

Para os experimentos, foram utilizados 5 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 Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA: 41/2017). Durante a estadia no biotério de experimentação do LANE, os animais passaram por 10 minutos de *handling* por dia, a fim de se habituar ao experimentador e os diferentes protocolos de manuseio pelos quais iriam passar.

## 3.2. Procedimento cirúrgico

### 3.2.1. Anestesia

Para anestesia geral, foi utilizado cetamina (cloridrato de cetamina a 10%, diluída em veículo estéril q.s.p) e a xilazina (cloridrato de xilazina a 2%, diluída em 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 do 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 (Bonther; Brasil). 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): -5,4mm; médio-lateral (ML) -4,6; 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) (**Figura 4A**). 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 ativo, permitindo a visualização em tempo real dos LFPs (do inglês, *local field potentials*) à medida que se aproximavam de suas respectivas regiões alvo. Dessa forma, um par de eletrodos trançados foi posicionado na camada CA1 do hipocampo, e um eletrodo monopolar no mPFC. Os eletrodos foram confeccionados no LANECS, 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 30 KHz (**Figura 4A**).

Um dia antes do início 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). Os registros foram feitos no período de menor atividade dos animais, de 11:00 às 17:00. Por fim, os animais tinham acesso à água e alimento *ad libitum*.

### 3.4. Tarefa do Labirinto de Barnes

A tarefa do Labirinto de Barnes (BM) foi desenvolvida por Carol Barnes em 1979 (Barnes, 1979) como uma forma de se avaliar o aprendizado de roedores sem a necessidade de gerar fatores de motivação extra para os animais executarem a tarefa. A tarefa do BM foi realizada tomando como base o trabalho de Rêgo (2014), que padronizou inicialmente esta tarefa no LANEK.

O aparato para a tarefa do Labirinto de Barnes consistiu em um disco de madeira suspenso a 150 cm do chão. O disco possuía 120 cm de diâmetro e apresentava 12 buracos (10 cm de diâmetro) distribuídos de forma equidistante a 5 cm da borda do disco. Um único buraco possuía uma caixa de escape associada a ele, enquanto os outros eram tapados por uma pequena placa de madeira. O contato físico dos animais com o aparato foi feito exclusivamente por uma placa de borracha acima do disco que foi utilizada para facilitar a higienização do aparato após cada sessão de aquisição. A intensidade luminosa na superfície do disco foi padronizada em ~70 lux, com 4 lâmpadas LED (40W) iluminando o labirinto indiretamente. Nesse sentido, a superfície do disco era aversiva ao animal devido à luminosidade intensa e à altura. Portanto, uma vez posicionado na superfície do disco, o animal buscava um local para se abrigar, nesse caso, a caixa de escape.

Em cada um dos dias de aquisição, os animais foram habituados à sala do BM por 10 minutos dentro de suas próprias caixas do biotério. Cada sessão de aquisição seguia os seguintes passos: 1 - Os animais eram colocados em uma caixa e posicionados no centro do labirinto; 2 - Após 15 segundos a caixa era erguida e o animal podia explorar o labirinto livremente por no máximo 3 minutos. Caso não encontrasse o buraco de escape ao longo dos 3 minutos, o animal era gentilmente guiado até lá; 3 - Uma vez no interior da caixa de escape, o animal era mantido neste local por 1 minuto e depois retornado à sua caixa do biotério. Foram realizadas um total de 4 sessões por dia, com um intervalo de 5 minutos entre cada uma delas. Durante estes intervalos, todos os elementos que tiveram algum contato físico com os animais eram higienizados com álcool 20%, incluindo a placa de borracha, as placas de madeira que cobriam os buracos, a caixa de escape e a caixa utilizada para posicionar o animal no centro do labirinto. No dia do teste, o mesmo aparato foi utilizado. Contudo, a caixa de escape foi retirada e o buraco associado a ela foi tapado com uma placa de madeira. Dessa forma, não seria possível o animal escapar do labirinto. A sessão de teste seguiu os seguintes passos: 1 - os animais eram colocados em uma caixa e posicionados no centro do labirinto; 2 - após 15 segundos, a caixa

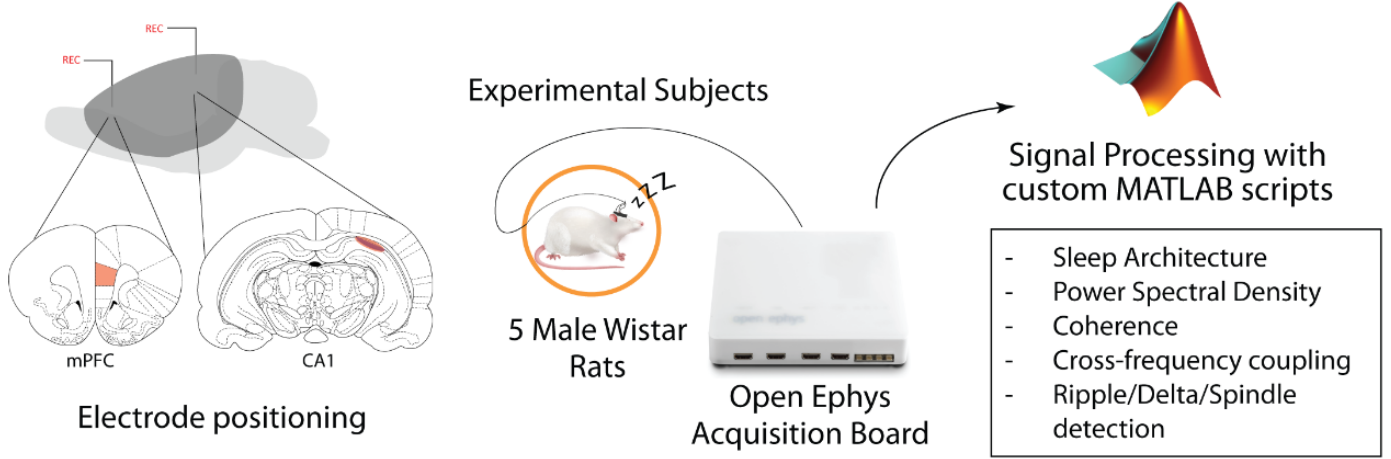
era erguida e o animal podia explorar o labirinto livremente por 2 minutos; 3 - após este período o animal era retornado à sua caixa do biotério. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera acima do labirinto, com a resolução de 1280x720p, a 30 fps. Utilizamos o software *OBS Studio* para registrar os vídeos (**Figura 4B**).

### **3.5. Protocolo experimental**

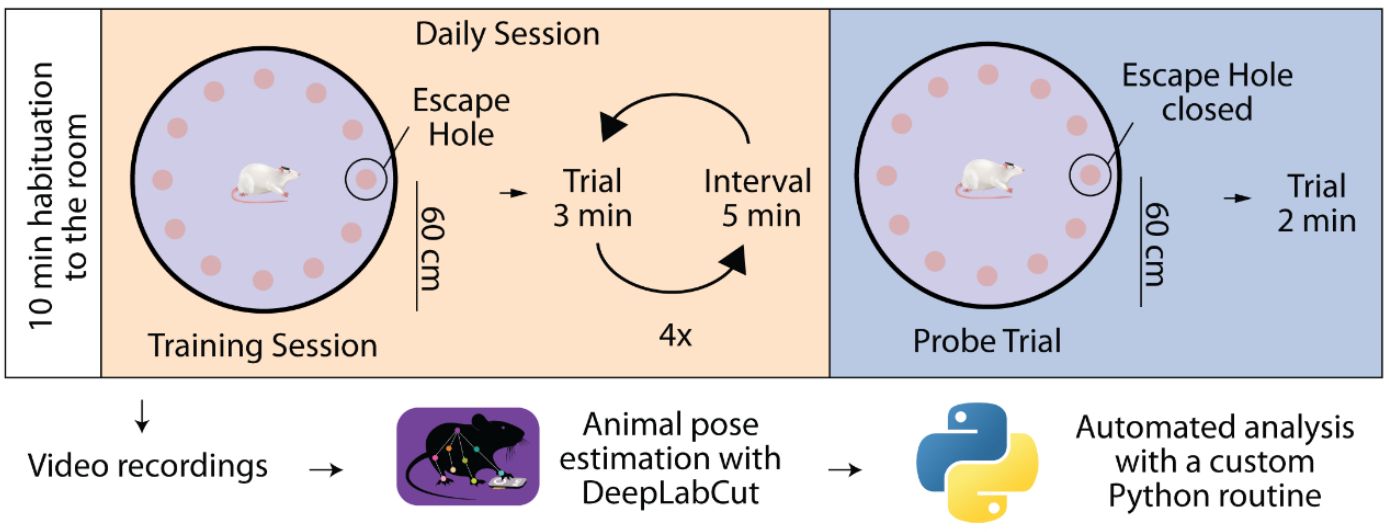
O protocolo experimental compreendeu 6 dias (**Figura 4C**):

- 1º dia: registro de linha de base (BL). Neste dia, os animais passaram apenas pelo registro eletrofisiológico no período de 11:00 - 17:00.
- 2º - 5º dias: registro dos dias D1-D4 de aquisição no BM. Nestes dias os animais passaram pelas sessões de aquisição no BM às 10:30 da manhã. Logo em seguida, os animais foram colocados na caixa de registro de sono. Os registros eletrofisiológicos começaram às 11:00 da manhã e terminaram às 17:00.
- 6º dia: sessão de teste no BM. Neste dia, os animais passaram pela sessão de teste no BM, que começou às 10:30 da manhã. Contudo, nenhum registro eletrofisiológico foi realizado neste dia.

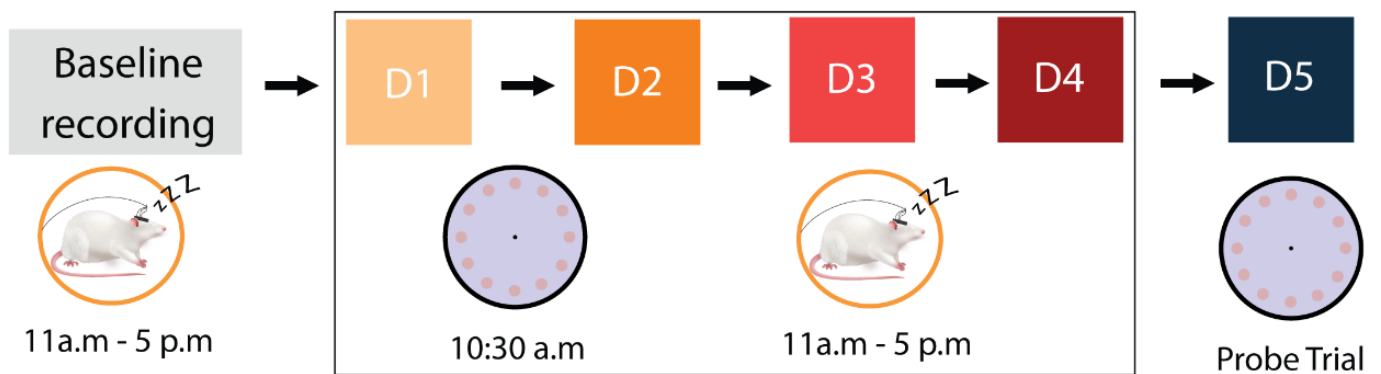
## A - Electrophysiological Recording:



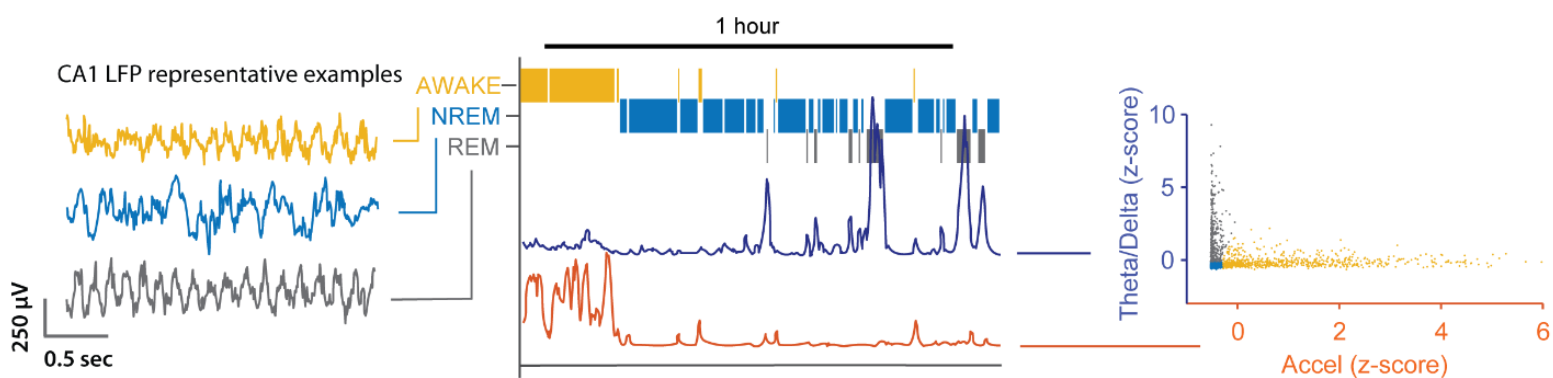
## B - Barnes Maze:



## C - Experimental Paradigm:



## D - Sleep-wake cycle classification



**Figura 4. Paradigma experimental.** **A** - Registros eletrofisiológicos. Os eletrodos de registro foram inseridos nas regiões do mPFC e CA1 (ressaltados em vermelho nas representações das fatias transversais). Os registros foram feitos utilizando a placa de aquisição do *Open Ephys*. Posteriormente, os sinais registrados foram processados e analisados por rotinas desenvolvidas em MATLAB. **B** - Labirinto de Barnes. Os dias de aquisição consistiram em 4 sessões com intervalos de 5 minutos. A sessão de teste consistiu em uma única sessão de 2 minutos. Todas as sessões foram gravadas e os vídeos foram utilizados para a extração de pose (DLC) e extração dos parâmetros de desempenho dos animais a partir de rotinas em Python. **C** - Paradigma experimental. Cada animal passou por um registro de linha de base, quatro dias de aquisição no BM seguido por registros eletrofisiológicos e um dia de teste no BM. **D** - Classificação do ciclo sono-vigília. À esquerda, sinais representativos do LFP de CA1 para o estado acordado (amarelo), NREM (azul) e REM (cinza). No centro, hipnograma representativo, razão Teta/Delta (azul), RMS do acelerômetro (laranja). À direita, gráfico de dispersão representativo de épocas do registro com relação à razão Teta/Delta e RMS do acelerômetro.

### 3.6. Lesão eletrolítica, perfusão e fixação do tecido nervoso

Após o último dia de registro, foi feita uma lesão eletrolítica nas regiões do mPFC e CA1 para a verificação do posicionamento dos eletrodos de registro. Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina, e a estimulação foi feita na intensidade de 1V durante 1s. Em seguida, os animais receberam *overdose* de cetamina e, após a cessação de funções vitais, foram perfundidos com uma solução tampão fosfato-salina (PBS – 250 ml) para limpar o tecido e paraformaldeído 4% (PFA – 200 ml) 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 30% 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.

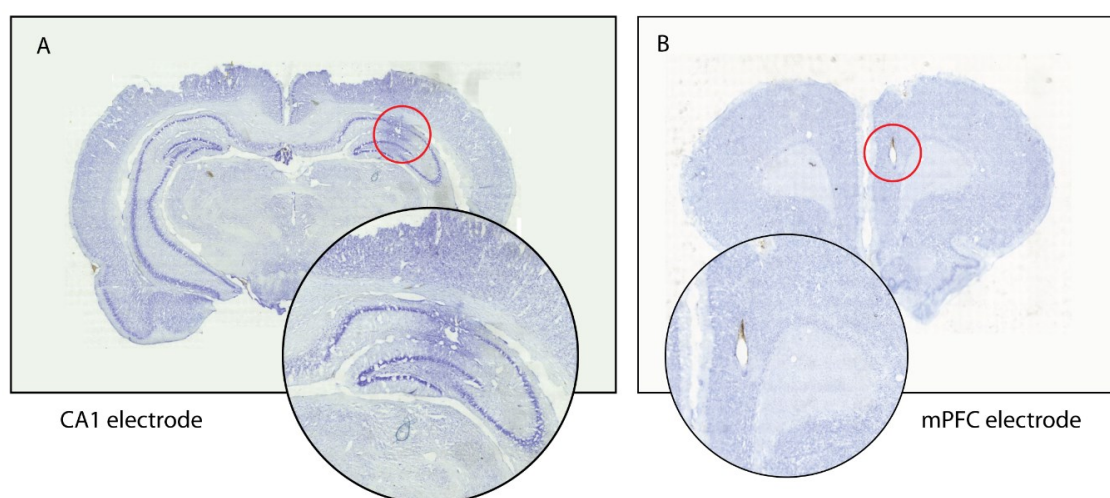
### 3.7. Histologia

Os encéfalos dos ratos Wistar foram submetidos à fixação com paraformaldeído a 4% e posteriormente congelados em isopentano para armazenamento. Em seguida, cada região cerebral foi cortada em seções de 40 µm de espessura, realizando de seis a dezoito cortes em busca de áreas com lesões eletrolíticas. Essas fatias foram cortadas utilizando um criostato e dispostas em

lâminas previamente tratadas com gelatina com o auxílio de um pincel para a confecção de lâminas histológicas.

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 envolve banhos sequenciais em álcool a 100%, 90%, 80%, 70% e água, seguidos por uma imersão em 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 3 minutos.

Finalmente, as lâminas foram montadas com Permount e lamínulas. Esse procedimento cuidadoso garante a preservação das amostras e permite a visualização da lesão eletrolítica (**Figura 5**).



**Figura 5. Cortes histológicos para definição do posicionamento dos eletrodos de registro. A** - Exemplo representativo de um corte frontal com uma lesão eletrolítica (círculo vermelho e ampliação) indicando a localização do par de eletrodos trançados posicionados em CA1, no hipocampo dorsal. **B** - Exemplo representativo de um corte frontal com uma lesão eletrolítica no mPFC indicando a posição do eletrodo de registro.

### 3.8. Análise dos sinais eletrofisiológicos

#### 3.8.1. Pré-processamento

Para os registros de LFP:

- 1 - Reamostragem do sinal de 30 KHz para 1000 Hz (função *decimate*; esta função filtra o sinal com um filtro IIR *Chebyshev Tipo I de 8º ordem* antes de realizar a amostragem)
- 2 - Remoção de tendências constantes (função *detrend*)
- 3 - Filtragem de passa-banda (0.7-250 Hz): *two-way least-squares FIR filtering* de 3426º ordem (função *eegfilt*)
- 4 - Separação em épocas de 10 segundos (função *reshape*)

Para os canais do acelerômetros:

- 1 - Extração da derivada de cada um dos eixos do acelerômetro (*dx, dy, dz*)
- 2 - Ortogonalização do sinal (desta forma, um único vetor foi extraído a partir dos três):

$$a(i) = \sqrt{dz(i)^2 + dx(i)^2 + dy(i)^2}$$

em que:

- *i* = índice da amostra do sinal
  - *x, y* e *z* são as derivadas de cada um dos 3 eixos
- 3 - Filtragem de passa-banda (3-100 Hz): *two-way least-squares FIR filtering* de 3426º ordem (função *eegfilt*)
  - 4 - Separação em épocas de 10 segundos (função *reshape*)

### 3.8.1.1 - Seleção do canal de registro de CA1 mais adequado

Os registros de CA1 foram realizados por meio de um par de eletrodos trançados. Dessa forma, foram obtidos dois canais de registro nesta região. Para todas as análises posteriores, o registro cujo eletrodo estivesse mais próximo da camada piramidal de CA1 foi selecionado. Esta seleção foi feita com base na amplitude média das SWRs detectadas a partir de cada um dos canais. A detecção das SWRs foi realizada conforme descrito no tópico **3.8.8 - Detecção de SWRs, Delta e Spindles** e a média do LFP filtrado das SWRs centrada no pico dos eventos foi computada. Posteriormente, por meio de uma inspeção visual, o canal com média do sinal com maior amplitude de pico foi selecionado.

### 3.8.2. Classificação do ciclo sono vigília

Para todas as análises posteriores, cada uma das épocas de 10 segundos dos sinais foram classificadas como um dos estados do ciclo sono-vigília (NREM, REM e estado acordado).

#### 3.8.2.2. 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.

A raiz do valor quadrático médio (RMS) do vetor do acelerômetro foi computada conforme a equação:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n a_i^2}{n}}$$

onde  $n$  é o número de amostras da época,  $i$  é o índice das amostras da época,  $a$  é a magnitude da amostra  $i$  (em  $\mu V$ ).

Por fim, os valores da razão T/D e do RMS do acelerômetro foram normalizados (z-score):

$$Z_{i\Box} = \frac{X_i - \underline{X}}{S}$$

onde  $X_{i\Box}$  é a razão T/D ou o RMS do acelerômetro da época  $i$ ,  $\underline{X}$  é a média da razão T/D ou RMS do acelerômetro de todas as épocas de 10 segundos, e  $S$  é o desvio padrão da razão T/D ou RMS do acelerômetro de todas as épocas de 10 segundos.



### 3.8.2.3. Detecção de artefatos

Os registros de LFP de CA1 e do acelerômetro passaram por uma etapa de exclusão de artefatos. Caso algum valor da época de 10 segundos alcançasse a amplitude da média + 7 desvios padrão, considerou-se a existência de um artefato e a época foi desconsiderada de análises posteriores.

### 3.8.2.4. 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). As funções ajustadas são representadas pela equação:

$$P(x) = \sum_{i=1}^k a_i \cdot N(x|\mu_i, \Sigma_i)$$

onde,  $\mu$  é a média da gaussiana  $i$ ,  $\Sigma$  é a matriz de covariância da gaussiana  $i$ ,  $a$  é a probabilidade da amostra  $x$  pertencer à gaussiana  $i$ , e  $k$  é o número de gaussianas definidas (grupo).

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 (TPR) e de verdadeiros positivos (FPR) para cada valor de probabilidade posterior de cada estado do ciclo sono-vigília:

$$TPR(x) = \frac{TP(x)}{TP(x) + FN(x)}$$

onde,  $x$  é um valor de probabilidade posterior (*para*  $x = 0, 0.001, 0.002, \dots 1$ )  $TP$  é o número de épocas de um estado corretamente classificadas pelo algoritmo em comparação com as épocas inspecionadas visualmente.  $FN$  é o número de épocas classificadas como determinado estado, porém classificadas incorretamente pelo algoritmo.

$$FPR(x) = \frac{FP(x)}{FP(x) + TN(x)}$$

onde,  $x$  é um valor de probabilidade posterior (*para*  $x = 0, 0.001, 0.002, \dots 1$ )  $FP$  é o número de épocas de um determinado estado incorretamente classificadas pelo algoritmo em comparação com a inspeção visual.  $TN$  é o número de épocas que não foram classificadas manualmente e que foram classificadas corretamente pelo algoritmo.

Sendo assim, cada valor de probabilidade posterior apresentou uma combinação de  $TPR$  e de  $FPR$ . 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 foram classificadas 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) (**Figura 4D**).

### 3.8.3. Arquitetura do sono

A partir da classificação dos estados do ciclo sono-vigília, os parâmetros relevantes à arquitetura do sono foram extraídos a partir de cada um dos registros. O (1) tempo despendido considera a fração do tempo despendido em cada estado em relação ao tempo total do registro. Os (2) bouts de cada estado foram definidos como um conjunto de épocas consecutivas de um mesmo estado totalizando no mínimo 20 segundos. A (3) latência para o sono foi definida como o tempo para o início do

primeiro bout de sono NREM do registro do dia. De forma semelhante, a (4) latência para o sono REM foi definida como o tempo para o início do primeiro bout de sono REM após o início do sono. Por fim, a (5) eficiência do sono foi definida como a porcentagem do tempo de registro despendido em sono (NREM e REM) em relação ao tempo total de registro.

### 3.8.4 Power Spectral Density (PSD) e Espectrogramas

O PSD de cada época do sinal foi computado utilizando-se 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), Gama Baixa (30-55 Hz), Gama Alta (65-90 Hz) e Gama Total (Gama Baixa + Gama Alta) foi calculada para cada uma das épocas.

Os espectrogramas de CA1 e mPFC foram gerados a partir da função *spectrogram*, do MATLAB (taxa de amostragem: 1000 Hz; tamanho da janela: 250 amostras; sobreposição: 500 amostras (50 %); limites de frequência: 0 - 20 Hz ou 130-250 Hz para demonstração de SWRs em CA1; NFFT: 2048);

### 3.8.5 Coerência de fase

A coerência de fase é uma medida que avalia o alinhamento da fase de uma frequência específica em dois sinais distintos (Lachaux et al. 1999). Nesse sentido, quando duas regiões do cérebro apresentam sinais com alta coerência de fase, elas estão provavelmente conectadas e ativamente modulando suas atividades (Bowyer, 2016). Para realizar o cálculo de coerência de fase entre os sinais de CA1 e o mPFC utilizou-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.

### 3.8.6 Coerência espectral

A Magnitude Quadrática da Coerência (MSC) ou coerência espectral é uma medida da correlação linear entre dois sinais considerando cada componente de frequência (Malekpour et al., 2018). Portanto, o MSC também pode ser interpretado como uma medida da similaridade do conteúdo de frequências de dois sinais e também como uma medida de conectividade funcional entre regiões do cérebro (Malekpour et al., 2012; Bowyer, 2016). Para o nosso trabalho, utilizamos o cálculo do MSC considerando os sinais das épocas de 10 segundos do mPFC e CA1. Para computar o MSC utilizou-se a função *mscohere* (NFFT: 4096; *window*: 1250; *noverlap*: 625). Posteriormente, o MSC médio para as bandas Delta (1-4 Hz), Teta (5-12Hz) e Gamma (30-90Hz) foi computado para cada uma das épocas de 10 segundos do sinal.

### 3.8.7 Acoplamento de frequência cruzada

O padrão de atividade oscilatória de bandas de frequência distintas não são estritamente independentes (Tort et al., 2008). Já foi observado que a fase de oscilações lentas modula a amplitude de oscilações de maior frequência. Por exemplo, a modulação da amplitude de Gama pela fase de Teta no hipocampo durante a evocação de uma memória de esquiva inibitória é importante para a reconsolidação desta memória (Radiske et al., 2020). Além disso, a amplitude de múltiplas sub-bandas de Gama é modulada pela fase de Teta durante momentos de tomada de decisão (Tort et al., 2008). Portanto, o acoplamento fase-amplitude de frequência cruzada durante o sono dos animais após o aprendizado na tarefa do BM pode revelar marcadores eletrofisiológicos importantes para o processo de consolidação de memórias. Para tal, utilizamos o trabalho de Tort et al., (2008) como referência para a implementação desta análise:

- 1 - o LFP de CA1 foi filtrado nas faixas de interesse utilizando a função *eegfilt*. Para o sinal referente à fase, utilizou-se as faixas Delta (1-4 Hz) e Teta (5-9 Hz). Para o sinal referente à amplitude, utilizou-se as faixas Gama Baixa (30-55 Hz), Gama Alta (65 - 90 Hz) e High Frequency Oscillations (90 - 140 Hz).
- 2 - a transformada de Hilbert (função *hilbert*) foi aplicada para cada sinal referente à fase (sF) e cada sinal referente à amplitude (sA). Posteriormente,

os valores de fase do sF foram extraídos (função *angle*). Dessa forma, tem-se uma combinação de séries temporais que indicam a amplitude do sinal sA para cada fase do sinal sF. Uma combinação de séries temporais de fase e amplitude foi criada para cada faixa de frequência descrita anteriormente.

- 3 - As fases de sF foram separadas em 18 grupos de 20° (0° a 360°) e a média de sA para cada grupo de fase foi computada.
- 4 - A medida de entropia H foi calculada:

$$H = - \sum_{j=1}^N p_j \log p_j$$

em que, N = número de grupos de fase (18)

e  $p_j$  é:

$$p_j = \frac{\langle sA \rangle_{sF(j)}}{\sum_{j=1}^N \langle sA \rangle_{sF(j)}}$$

- 5 - Por fim, o MI é obtido ao normalizar H por valor máximo possível de entropia ( $H_{max}$ ), que é o logaritmo do número de grupos de fase, ou  $\log(N)$ .

$$MI = \frac{H_{max} - H}{H_{max}}$$

Nesse caso, um MI com valor 0 indica uma ausência de modulação fase-amplitude e um valor de MI maior indica uma maior modulação fase-amplitude.

### 3.8.8 Detecção de SWRs, Delta e Spindles

Para a detecção de SWRs, o LFP de CA1 foi filtrado (filtro passa-banda FIR com fase linear, 100-250 Hz, função *eegfilt*) e elevado ao quadrado. Posteriormente, a média foi calculada com um filtro FIR de fase zero (62° ordem) e o sinal foi normalizado (z-score). O início e o fim dos eventos de SWRs putativos foram inicialmente detectados quando a potência média do sinal cruzou 1 desvio padrão (calculado a partir de todas as épocas de sono NREM de um mesmo animal). Eventos

consecutivos com uma distância menor que 50 ms foram conjugados e eventos com duração menor que 50 ms e maior que 450 ms foram eliminados. Por fim, apenas eventos cujo pico de potência fosse maior que 3 e menor 250 desvios padrões foram considerados.

Para a detecção de ondas Delta, o LFP do mPFC foi filtrado (filtro passa-banda FIR com fase linear, 1-4 Hz, função *eegfilt*) e normalizado (z-score). A derivada do sinal foi computada e os índices com cruzamento em zero foram extraídos. O início, pico e fim de cada evento putativo foram definidos com base nos índices de cruzamento em zero. Eventos putativos nos quais o módulo da amplitude(pico)-amplitude(início) e o módulo da amplitude(pico)-amplitude(fim) fossem maiores que 2,8 desvios padrões foram considerados.

Para a detecção de Spindles, o método utilizado foi baseado no trabalho de Maingret et al. (2016). O LFP do mPFC foi filtrado (filtro passa-banda FIR com fase linear, 10-16 Hz, função *eegfilt*) e normalizado (z-score). Posteriormente o sinal passou por uma transformada de Hilbert e foi suavizado utilizando uma média móvel de 100 ms. As spindles putativas foram eventos que se mantiveram acima de 0.3 desvios padrões por mais de 0,5 s e que tiveram um pico de mais de 2 desvios padrões. Eventos com duração menor que 0,4 s e maior que 3 segundos foram descartados.

A detecção de eventos acoplados de SWRs-Delta considerou a ocorrência do pico de ondas Delta entre 50 e 250 ms após o pico das SWRs. Para Delta-SWRs, uma diferença de 50 a 400 ms entre o pico da onda Delta e o pico das SWR. Para Delta-Spindle, uma diferença de 100 ms a 1,3 s entre o pico da Delta e o pico da Spindle. E para SWR-Delta-Spindle, considerou-se as ondas Delta, que estivessem acopladas simultaneamente a uma SWR e a uma Spindle.

### **3.9. Análise dos registros de vídeo da tarefa do BM**

#### **3.9.1. Pré-processamento dos vídeos**

Os vídeos de cada uma das sessões de aquisição e de teste do BM foram editados (Vegas Pro 17) a fim de padronizar o início e o fim de cada sessão. O início da sessão foi definido como o último *frame* em que o animal estivesse no interior da caixa de contenção. Já o fim da sessão foi definido como o primeiro *frame* em que o

animal estivesse completamente dentro da caixa de escape, ou quando a sessão chegou ao limite de tempo (3 min para a aquisição e 2 min para o teste). Os vídeos de cada sessão foram exportados no formato MP4 (1280x720p; 30 fps).

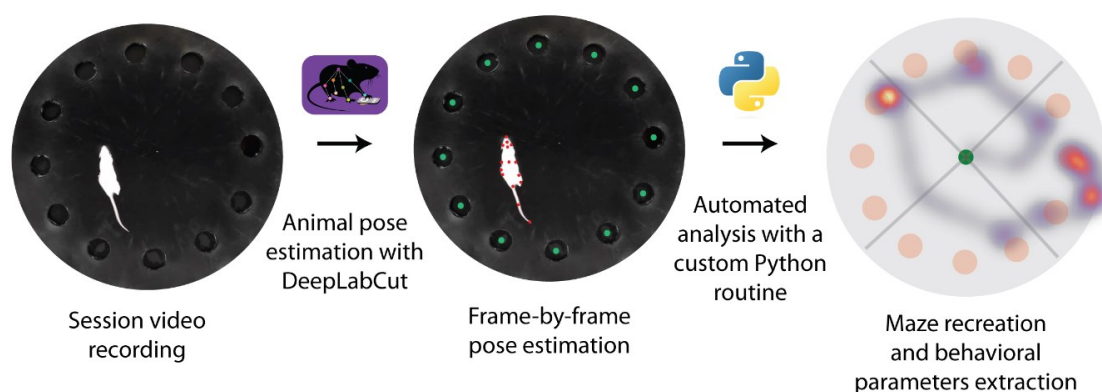
### 3.9.2. Extração de pose pelo *DeepLabCut*

Para análise automatizada da tarefa do BM empregamos o software de código aberto *DeepLabCut* v2.3.5 (Mathis et al., 2018) (DLC). O DLC utiliza redes neurais profundas para a estimativa de pose de animais a partir de registros de vídeo. Inicialmente, uma rede neural foi treinada (ResNet-50) a partir de 300 frames extraídos de um conjunto de 40 sessões. Um total de 8 regiões do corpo dos animais foram rotuladas em cada um dos frames: base do rabo, orelha direita, orelha esquerda, centro da cabeça, focinho, centro do corpo, lateral direita e lateral esquerda do corpo. Além disso, cada um dos 12 buracos do Labirinto de Barnes foi rotulado. A rede neural foi treinada com um total de 1200000 iterações. Posteriormente, cada um das sessões foi analisada utilizando a rede neural treinada e a posição de cada região do animal foi rastreada *frame-a-frame*. Cerca de 400 vídeos foram analisados utilizando a rede neural e os resultados foram exportados em arquivos HDF5 (**Figura 6**).

### 3.9.3. Extração automática dos parâmetros comportamentais

Com a localização de cada região do animal rotulada *frame-a-frame*, os arquivos foram analisados por meio de rotinas desenvolvidas em Python. A latência de escape, velocidade média, distância percorrida, a estratégia utilizada e o tempo em cada quadrante foram extraídos para cada sessão. Além disso, os erros primários e secundários foram contabilizados. Um erro primário consiste em um único evento de exploração de um buraco errado e um erro secundário é a reincidência do erro exploração de um buraco errado (**Figura 6**).

As rotinas em Python, vídeos representativos e testes para a validação do método estão disponíveis em <https://github.com/ikaro-beraldo/barnes-maze-python-routines>.



**Figura 6 - Análise dos registros de vídeo das sessões no Labirinto de Barnes.** Todas as sessões do BM foram registradas em vídeo. Posteriormente, o DLC foi utilizado para a estimativa de pose dos animais *frame-a-frame* e para a definição da localização dos buracos do labirinto. Por fim, a partir de rotinas desenvolvidas em *Python*, os parâmetros comportamentais relevantes foram extraídos com base nos resultados gerados pelo DLC.

## 4 - Resultados

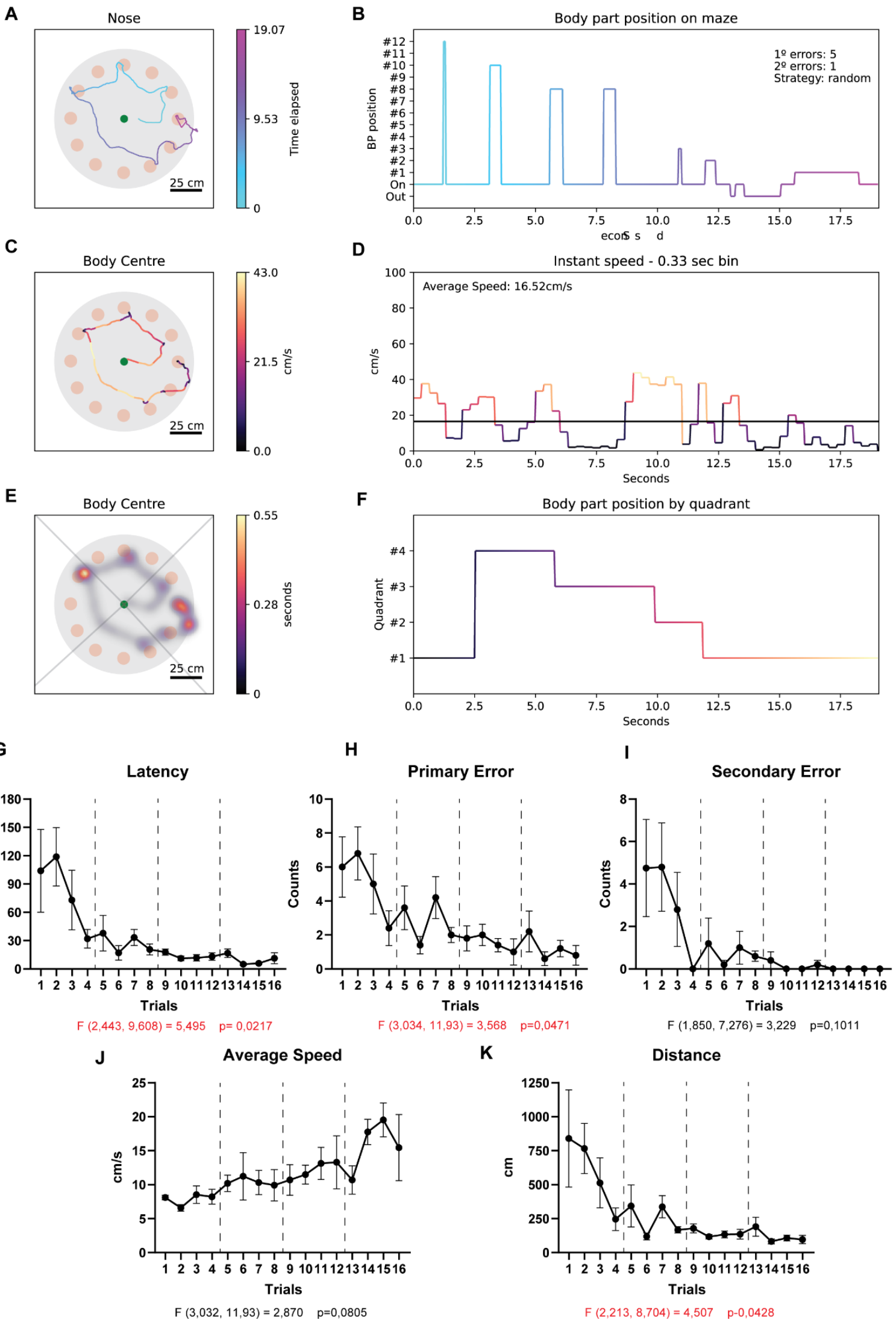
### 4.1 - Resultados comportamentos do Labirinto de Barnes

#### 4.1.1 - Comparação ao longo das sessões no BM

Para garantir que os animais consolidaram a memória espacial referente ao local de escape no BM avaliamos parâmetros classicamente descritos na literatura (Barnes, 1979; Pitts, 2018; Binder et al. 2019), a saber: latência de escape, número de erros primários e secundários, velocidade média, distância percorrida e tempo despendido em cada quadrante do labirinto em cada sessão de aquisição (**Figura 7A-F**). O teste Anova de uma via de medidas repetidas revela uma diferença na latência média [ $F(2,443, 9,608) = 5,495$   $p = 0,0217$ ], no número de erros primários [ $F(3,034, 11,93) = 3,568$   $p = 0,0471$ ] e na distância percorrida pelos animais [ $F(2,213, 8,704) = 4,507$   $p = 0,0428$ ] ao longo das sessões de aquisição (**Figura 7G,H e K**). Contudo, o teste post hoc de Dunnett não foi capaz de indicar entre quais sessões de aquisição tais diferenças se encontram. Além disso, O teste Anova de uma via de medidas repetidas não revelou diferenças no número de erros secundários [ $F(1,850, 7,276) = 3,229$   $p = 0,1011$ ], na velocidade média [ $F(3,032, 11,93) = 2,870$   $p = 0,0805$ ] e na fração do tempo total que os animais exploraram o quadrante alvo [ $F(2,869, 12,05) = 2,107$ ].



$p=0,1540$ ] (**Figura 7I,J e Figura 8A**). Por fim, o teste do qui-quadrado não revelou diferenças estatisticamente significativas na utilização de estratégias específicas ao longo das sessões de aquisição [Chi-square (df=30) = 37,14  $p= 0,1732$ ] (**Figura 8B**). Em suma, demonstramos que os animais consolidam a memória de localização do escape ao longo das sessões de aquisição e apresentam um aumento no desempenho na tarefa do BM.

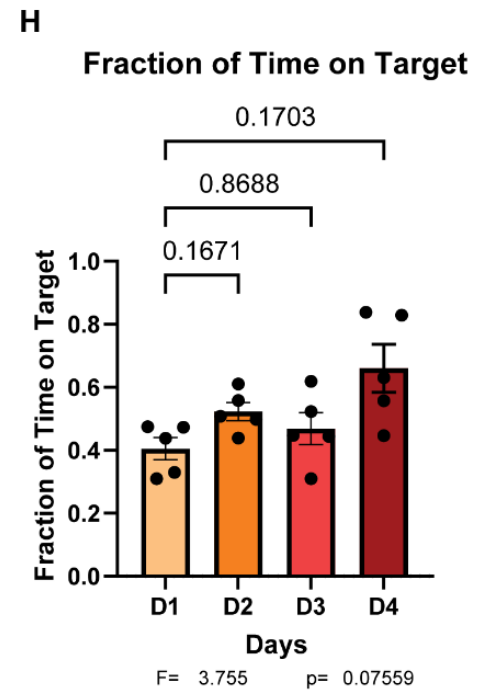
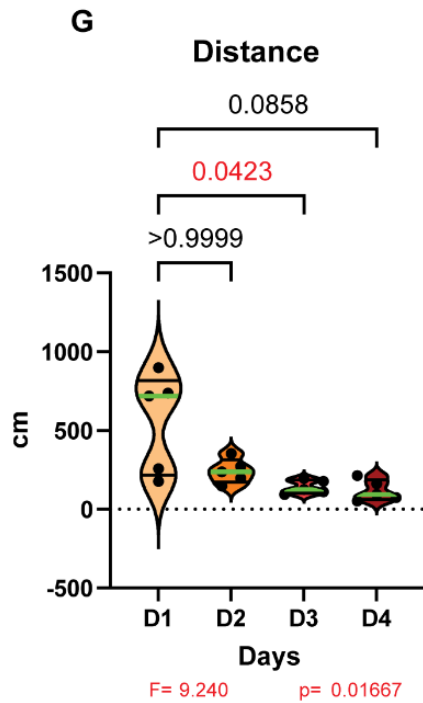
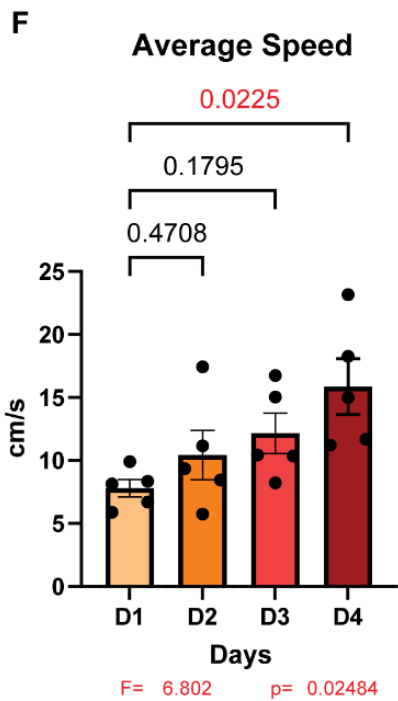
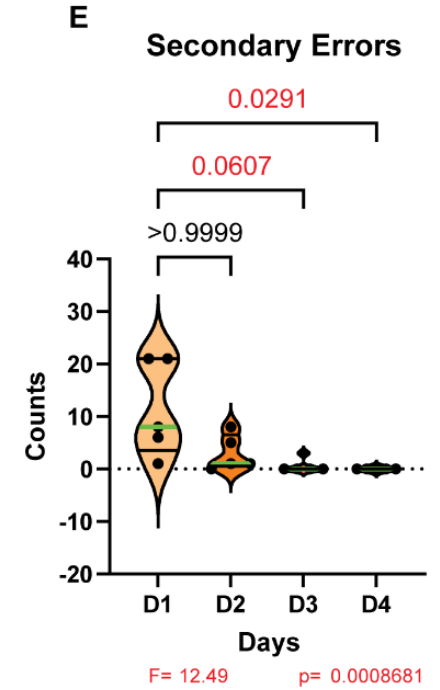
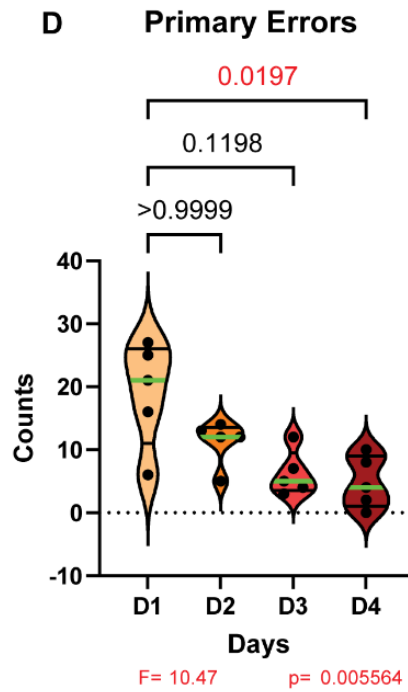
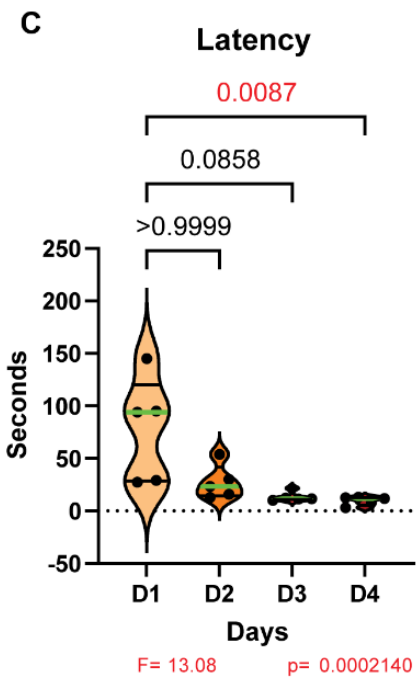
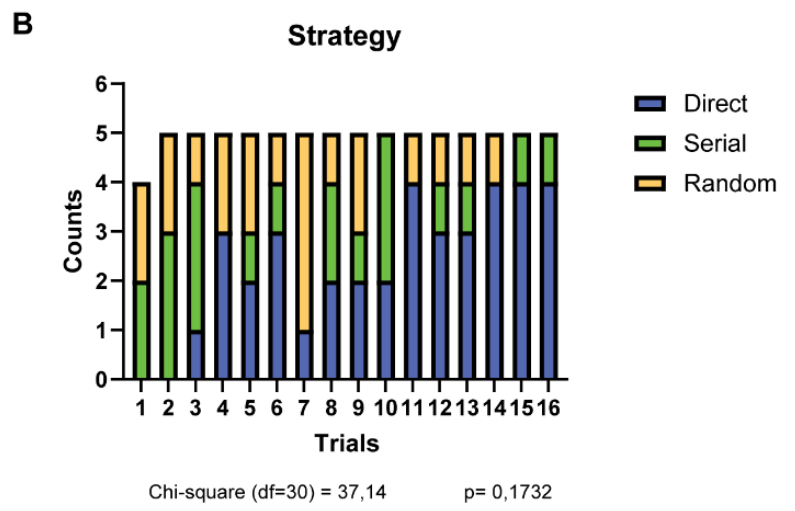
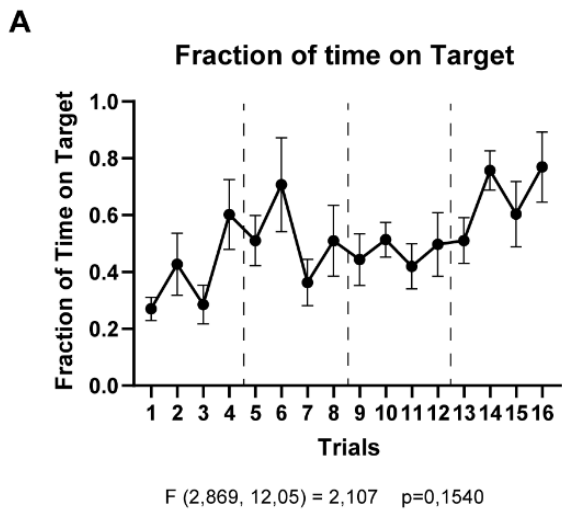


**Figura 7 - Exemplos representativos de parâmetros comportamentais avaliados durante as sessões de aquisição no BM.** **A** - Recriação do Labirinto de Barnes indicando a trajetória do focinho do animal ao longo da sessão. A escala de cor indica a passagem de tempo durante o trajeto. **B** - Localização do focinho do animal em regiões específicas do BM ao longo da sessão de aquisição. Cada buraco tem uma numeração (de '1 - 12'), enquanto a superfície do labirinto é rotulada como 'on' e a parte externa ao labirinto como 'out'. A contagem de erros primários e secundários e a estratégia utilizada pelo animal durante a sessão também é descrita. **C** - Recriação do Labirinto de Barnes indicando a trajetória do centro do corpo do animal ao longo da sessão. A escala de cor indica a velocidade instantânea do animal nos diferentes momentos do trajeto. **D** - Velocidade instantânea do animal ao longo da sessão de aquisição. A escala de cor utilizada é a mesma do painel **C**. A linha horizontal indica a velocidade média durante a sessão. **E** - Recriação do Labirinto de Barnes indicando o tempo despendido pelo animal em cada região do labirinto. As linhas que atravessam o labirinto são os limites de cada um dos quadrantes. A escala de calor indica a duração do tempo despendido em cada região do labirinto. **F** - Posição do animal em relação aos quadrantes do labirinto ao longo da sessão de aquisição. **G** - Latência de escape média ao longo de todas as sessões de aquisição no BM. **H** - Contagem média de erros primários ao longo das sessões de aquisição. **I** - Contagem média de erros secundários ao longo das sessões de aquisição. **J** - Velocidade média dos animais ao longo das sessões de aquisição. **K** - Distância média percorrida ao longo das sessões. Nos painéis **G-K**, as linhas verticais tracejadas indicam as separações entre os dias de aquisição e as barras de erro representam o erro padrão da média.

#### 4.1.2 - Comparação ao longo dos dias de aprendizado no BM

Em seguida, testamos se tal curva de aprendizagem também pode ser observada quando avaliamos as médias das sessões ao longo dos dias de aquisição no BM. Observamos uma redução da latência de escape média no D4 em comparação ao D1 [Rank diff D1vsD4: 13.00; Friedman statistic = 13.08,  $p=0.0002140$ , Dunn's multiple comparisons test: D1vsD4:  $p=0.0087$ ] (**Figura 8C**). Houve também uma redução no número de erros primários no D4 em comparação ao D1 [Rank diff D1vsD4: 12,00; Friedman statistic = 10.47  $p=0.005564$ , Dunn's multiple comparisons test: D1vsD4:  $p=0.0197$ ] (**Figura 8D**) e no número de erros secundários no D3 e D4 em comparação ao D1 [Rank diff D1vsD3: 10.50; D1vsD4: 11.50; Friedman statistic = 12.49  $p=0.0008681$ , Dunn's multiple comparisons test: D1vsD3:  $p=0.0607$ , D1vsD4:  $p=0.0291$ ] (**Figura 8E**). Além disso, houve um aumento velocidade média no D4 em comparação ao D1 [Mean diff: D4vsD1: -8,063; RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1,753, 7,013) = 6,802$ ;  $P=0.02484$ , post hoc Tukey test: D4vsD1:  $p=0.0225$ ] (**Figura 8F**) e

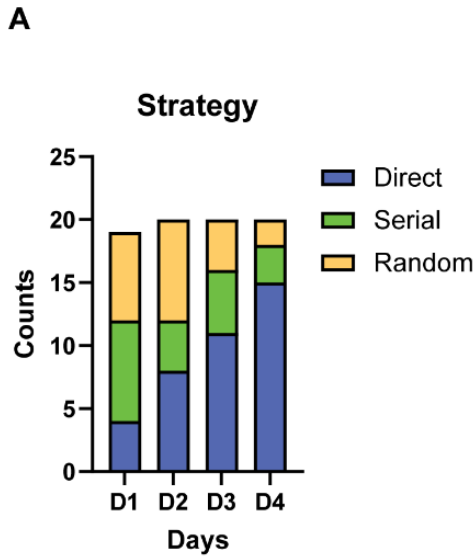
uma redução na distância percorrida no D3 em comparação ao D1 [Rank diff D1vsD3: 11.00; Friedman statistic = 9.240  $p=0.01667$ , Dunn's multiple comparisons test: D1vsD3:  $p=0.0423$ ] (**Figura 8G**). Entretanto, não observamos mudanças na fração do tempo gasta explorando o quadrante alvo [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.882, 7.527) = 3.755$ ;  $P=0.0756$ , post hoc Tukey test:  $p>0.05$ ] (**Figura 8H**). A estratégia utilizada pelos animais ao longo dos dias apresentou mudanças estatisticamente significativas [Chi-square test ( $df = 6$ ) = 14,05,  $p = 0.0291$ ] (**Figura 9A**). Nesse sentido, a utilização da estratégia direta aumentou no D4 em relação ao D1 [Rank diff D1vsD4: -11.50; Friedman statistic = 9.267,  $p=0.01396$ , Dunn's multiple comparisons test: D1vsD4:  $p=0.0291$ ] (**Figura 9B**). Contudo, o teste de Friedman não foi capaz de indicar variações na utilização da estratégia serial [Friedman statistic = 3.649,  $p=0.3576$ , Dunn's multiple comparisons test:  $p>0.05$ ] (**Figura 9C**) ou aleatória [Friedman statistic = 5.842,  $p=0.1155$ , Dunn's multiple comparisons test:  $p>0.05$ ] (**Figura 9D**).



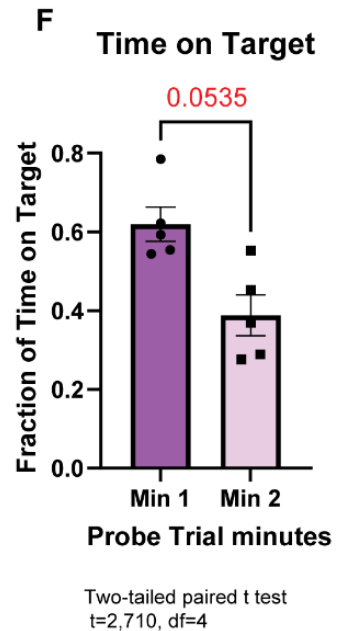
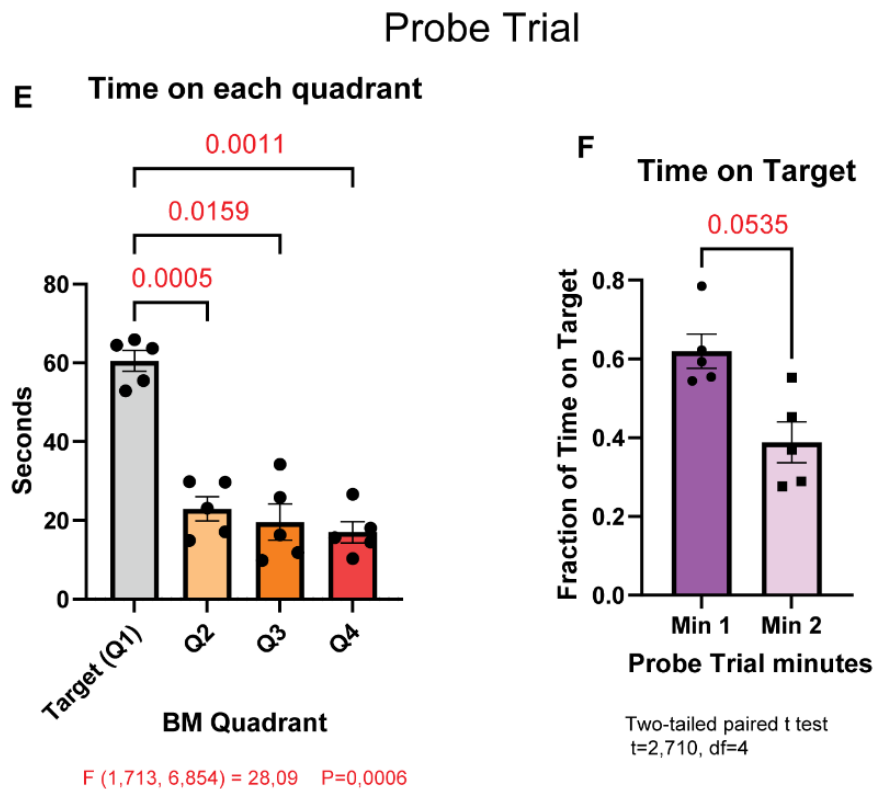
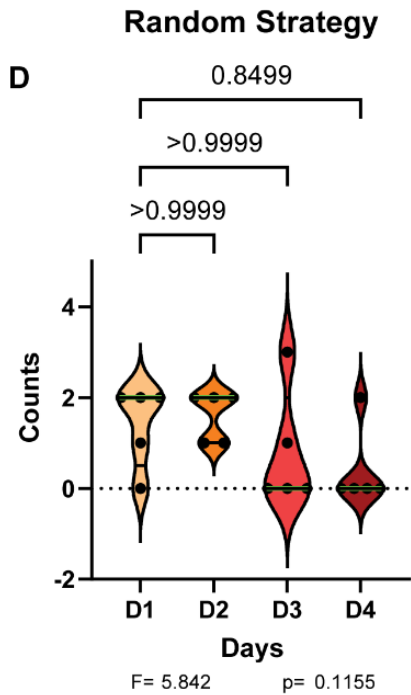
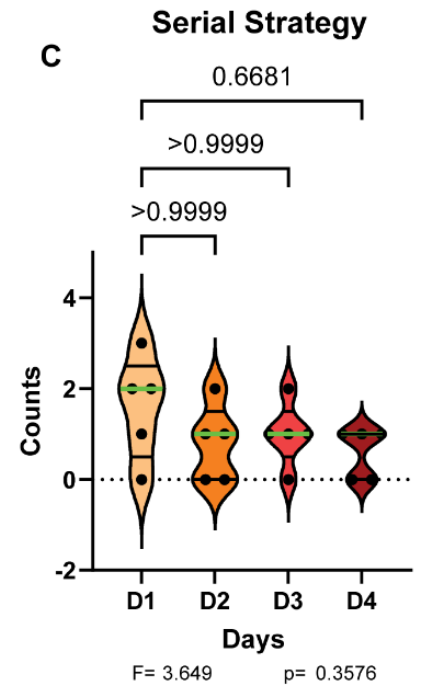
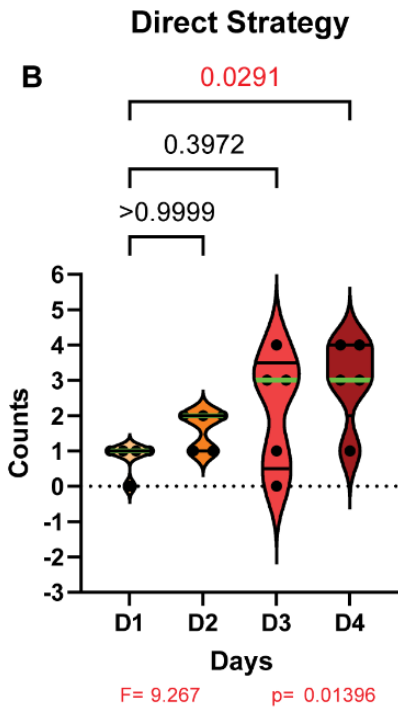
**Figura 8 - Parâmetros comportamentais avaliados durante as sessões de aquisição no BM.** **A** - Fração do tempo que o animal despendeu no quadrante alvo ao longo das sessões. As linhas verticais tracejadas indicam as separações entre os dias de aquisição. **B** - Contagem do tipo de estratégia utilizada pelos animais ao longo das sessões de treino **C** - Latência de escape média ao longo dos dias de aquisição no BM. **D** - Contagem média de erros primários ao longo dos dias de aquisição. **E** - Contagem média de erros secundários ao longo dos dias de aquisição. **F** - Velocidade média dos animais ao longo dos dias de aquisição. **G** - Distância média percorrida ao longo dos dias de aquisição. **H** - Fração do tempo que o animal despendeu no quadrante alvo ao longo dos dias de aquisição.

#### 4.1.3 - Sessão de teste no BM

A sessão de teste é utilizada como o critério final de avaliação da eficácia da consolidação da memória na tarefa do BM. Correlacionamos os parâmetros comportamentais extraídos desta sessão e alguns dados eletrofisiológicos para assim poder inferir possíveis marcadores eletrofisiológicos do processo de consolidação de memórias. Nesse caso, observamos uma diferença estatisticamente significativa entre a média de tempo despendido no quadrante alvo em relação aos outros quadrantes [Mean diff: D1vsD2: 37.59; D1vsD3: 40.93; D1vsD4: 43.51; RM One-way-ANOVA; Quadrantes:  $F(1,713, 6,854) = 28,09$   $P=0,0006$ , post hoc Tukey test: D1vsD2:  $p=0.0005$ ; D1vsD3:  $p=0.0159$ ; D1vsD4:  $p=0.0011$ ] (**Figura 9E**). Além disso, a fração do tempo gasta explorando o quadrante alvo é maior no primeiro minuto quando comparada ao segundo minuto [Two-tailed paired t-test  $t=2,710$ ,  $df=4$ ,  $p = 0.0535$ ] (**Figura 9F**).



Chi-square test (df = 6) = 14,05  
 $p = 0.0291$



**Figura 9 - Estratégia utilizada ao longo dos dias de aquisição e medida da eficiência da consolidação de memória pela sessão de teste. A** - Contagem do tipo de estratégia utilizada pelos animais ao longo dos dias de treino **B** - Contagem do número de vezes que a estratégia direta foi utilizada pelos animais ao longo dos dias de aquisição. **C** - Contagem do número de vezes que a estratégia serial foi utilizada pelos animais ao longo dos dias de aquisição. **D** - Contagem do número de vezes que a estratégia aleatória foi utilizada pelos animais ao longo dos dias de aquisição. **E** - Tempo médio despendido em cada um dos quadrantes do BM durante a sessão de teste. **F** - Fração média de tempo despendida no quadrante alvo nos minutos 1 e 2 durante a sessão de teste do BM.

## 4.2 - Caracterização eletrofisiológica do ciclo sono-vigília

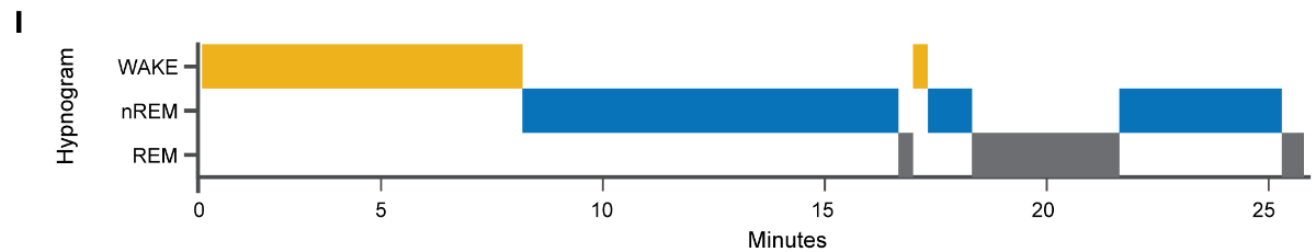
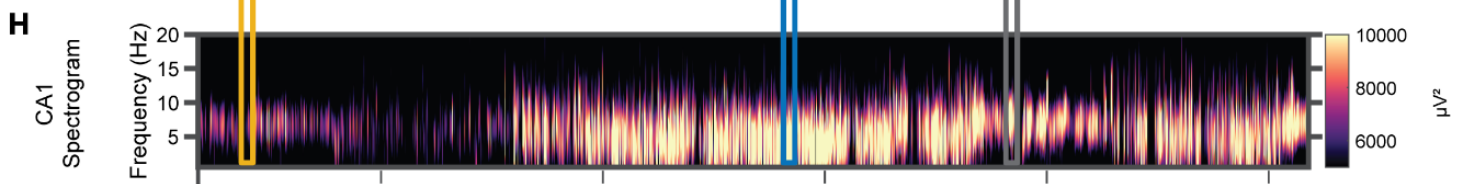
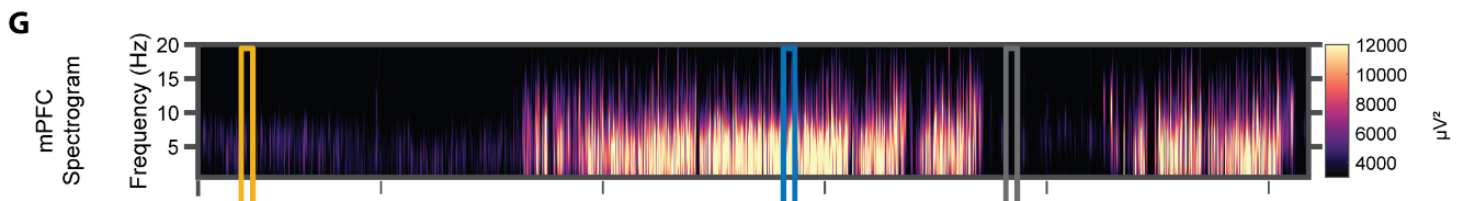
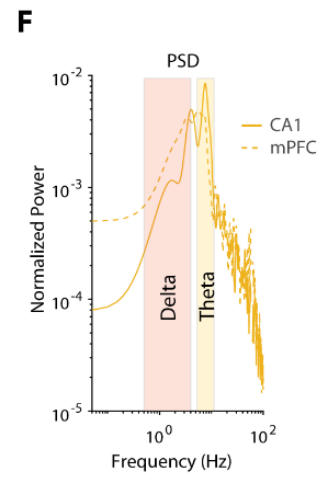
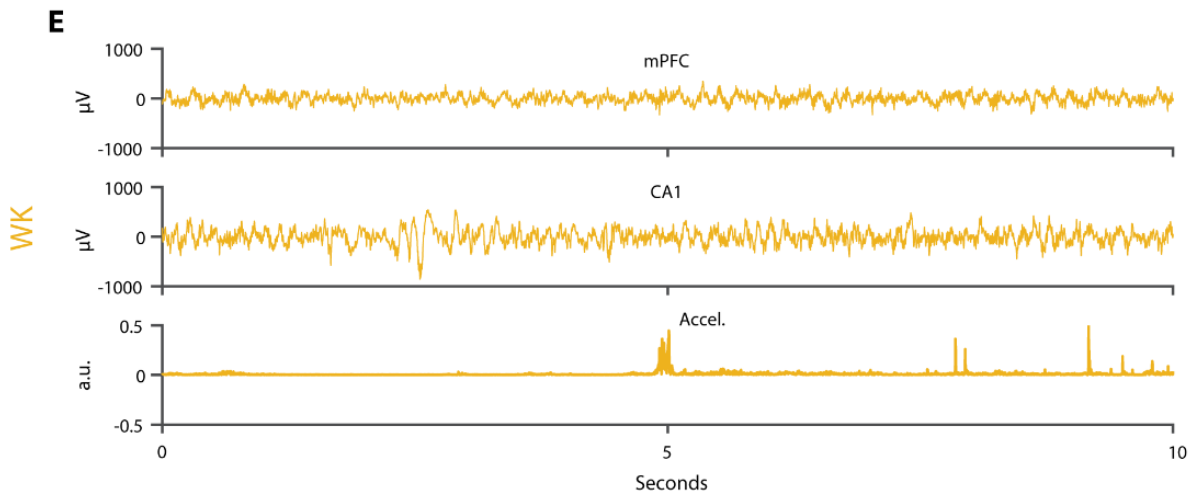
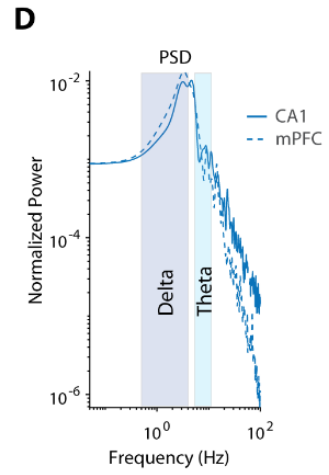
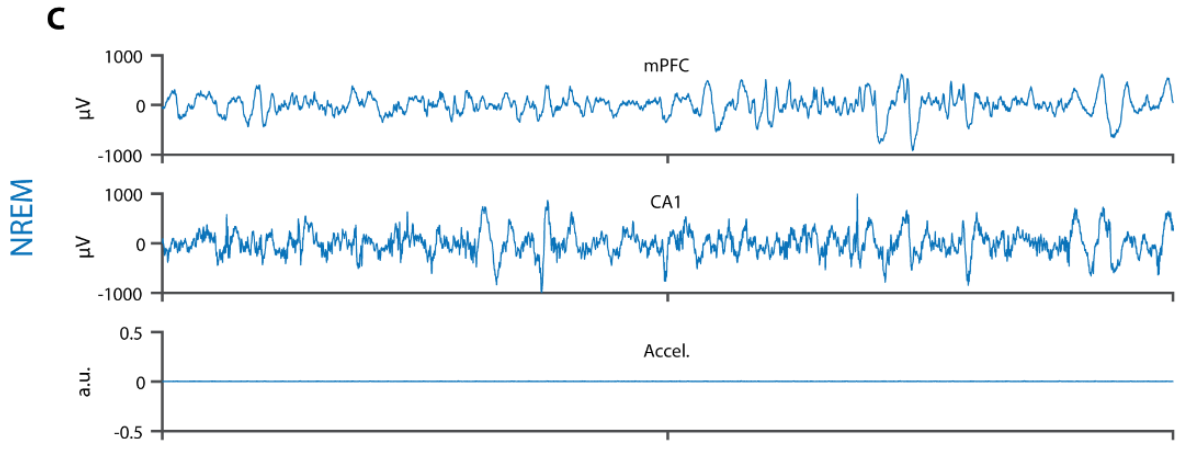
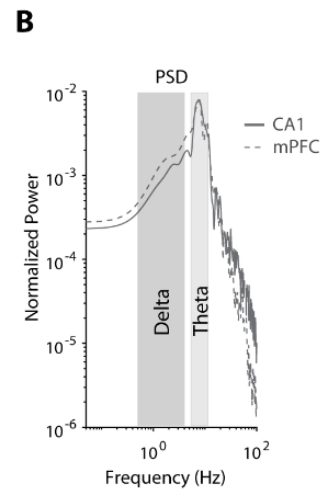
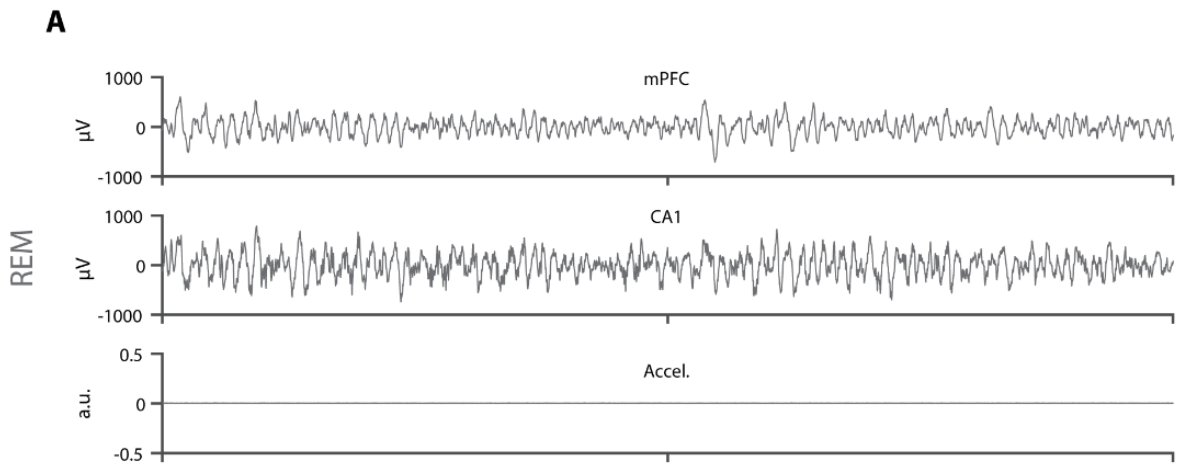
Inicialmente, após realizar a classificação do ciclo sono-vigília, caracterizamos os diferentes estados conforme suas características espectrais. Esta etapa é importante para garantir uma classificação do ciclo sono-vigília de alta qualidade e para conhecer profundamente os sinais registrados.

As épocas de sono REM apresentaram um pico de potência na faixa Teta nos registros de CA1 e mPFC e atividade do acelerômetro reduzida (**Figura 10A e B**). As épocas de sono NREM apresentaram um pico de potência na faixa de Delta nos registros de CA1 e mPFC, e como o sono REM, atividade do acelerômetro reduzida (**Figura 10C e D**). Por fim, as épocas WK apresentaram uma potência alta ou intermediária na faixa de Teta e baixa potência na faixa Delta. Além disso, o principal marcador das épocas WK é a potência na faixa Gama elevada em CA1 e mPFC e alta atividade do acelerômetro (**Figura 10E e F**). As características espectrais dos sinais de CA1 e mPFC para cada estado do ciclo sono-vigília também podem ser observadas nos espectrogramas (**Figura 10G, H e I**).

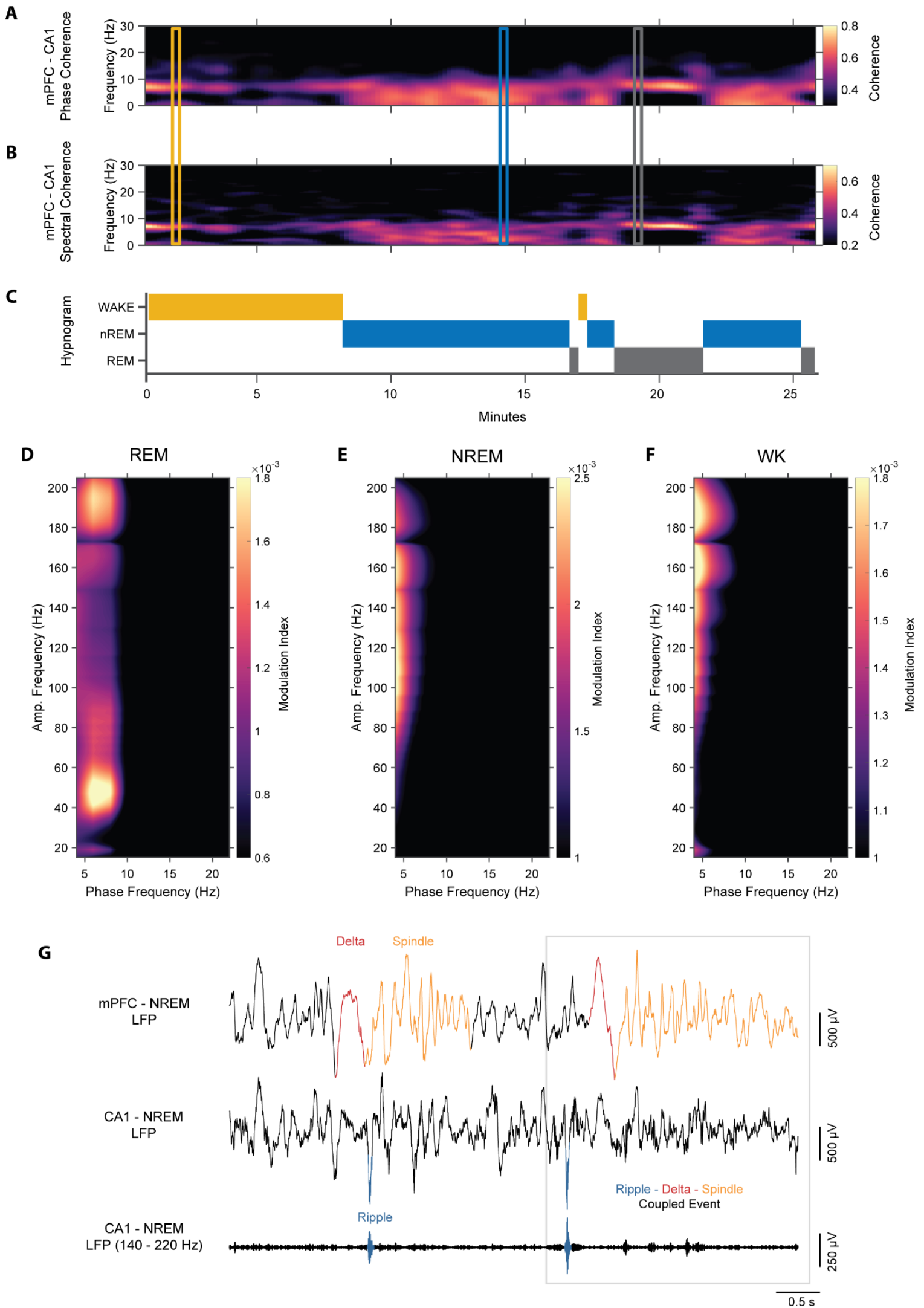
As épocas de sono REM e do estado WK apresentaram alta coerência espectral e de fase entre CA1 e o mPFC na faixa de Teta (5-9 Hz) e as épocas de sono NREM apresentaram alta coerência espectral e de fase na faixa de Delta (1-4 Hz) (**Figura 11 A e B**). Em relação ao acoplamento de frequência cruzada, as épocas de sono REM apresentaram grupos de modulação da amplitude das faixas 30-55 Hz, 65-90 Hz, 90-140 Hz, 150-170 Hz e 180-200 Hz pela fase da faixa de Teta (5-9 Hz). As épocas de sono NREM e WK apresentaram grupos de modulação da amplitude das faixas 90-140 Hz, 150-170 Hz e 180-200 Hz pela fase da faixa de Delta (1-4 Hz) e Teta (5-9 Hz) (**Figura 11 D, E e F**).



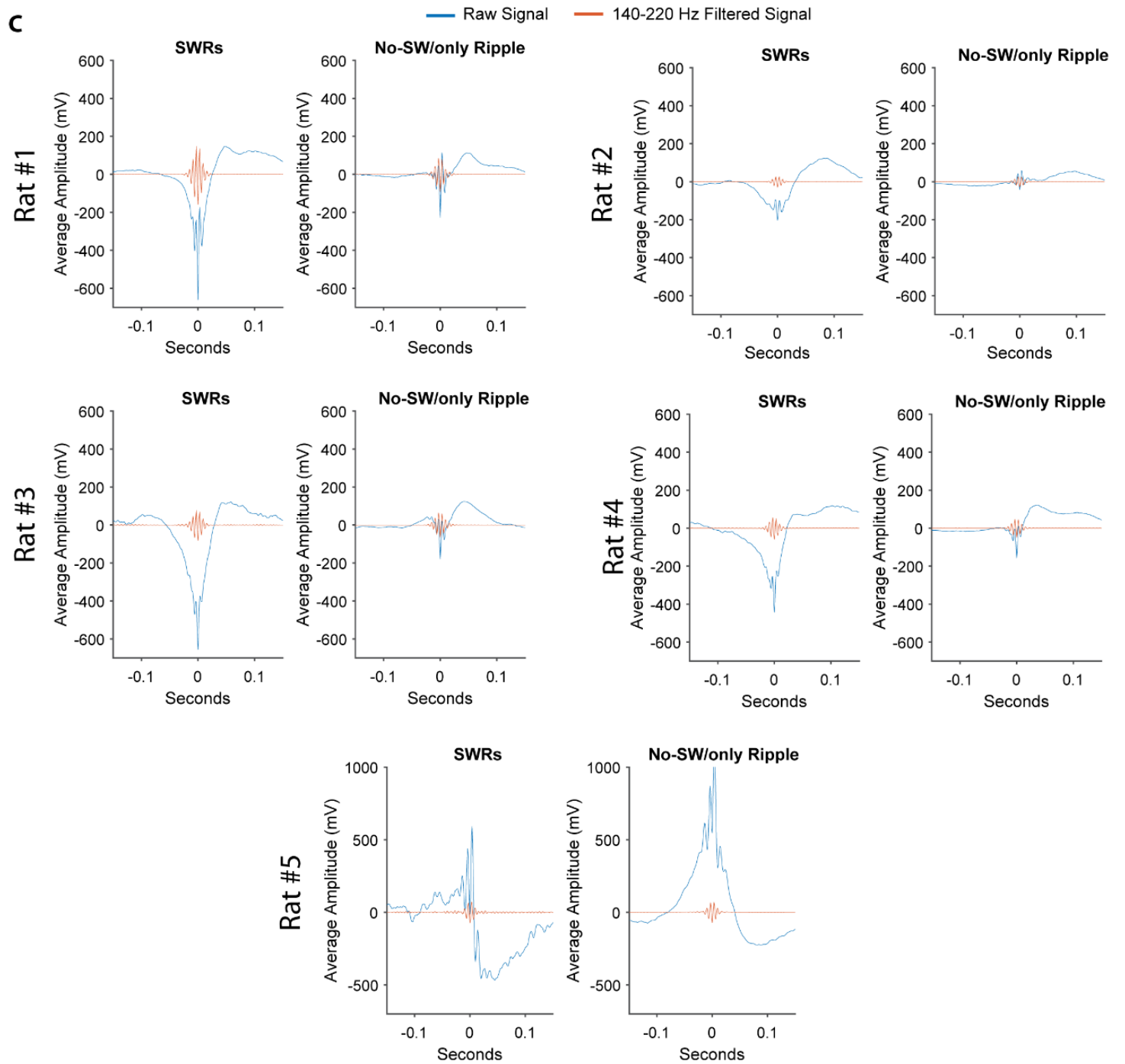
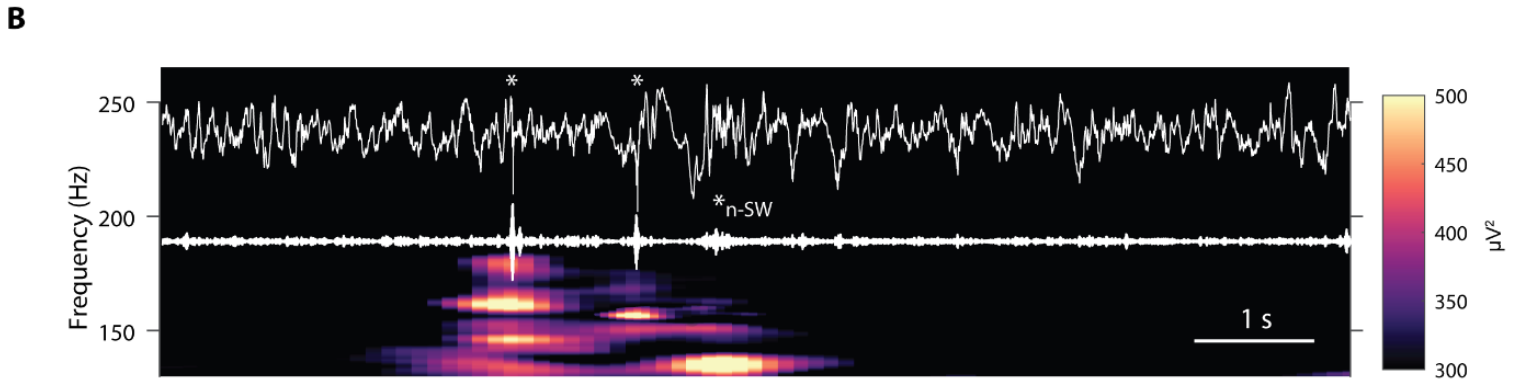
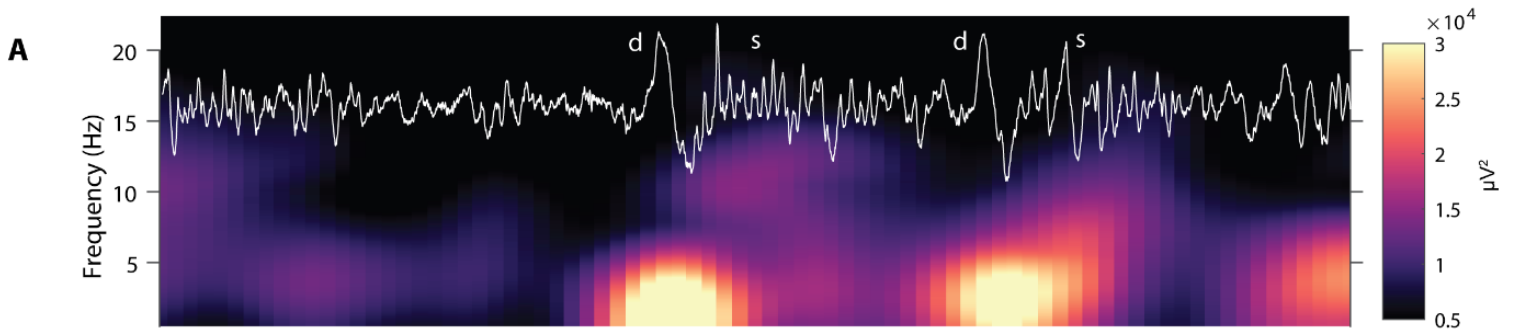
As ondas Delta foram detectadas no mPFC como eventos oscilatórios transientes de alta amplitude, na faixa 1-4 Hz. As Spindles foram detectadas como eventos oscilatórios na faixa de 12-15 Hz. As SWRs hipocampais foram detectadas como eventos de alta amplitude na faixa de 140-220 Hz. Parte das *Ripples* foram acompanhadas por *sharp waves*. Além disso, estes eventos apresentaram ocorrências acopladas temporalmente (**Figura 11 G e Figura 12 A, B e C**).



**Figura 10 - Características espectrais de cada época do ciclo sono-vigília. A** - Registros de LFP e Accel representativos de uma época de 10 segundos de sono REM. **B** - PSD da época representada em **A**. **C** - Registros de LFP e Accel representativos de uma época de 10 segundos de sono REM. **D** - PSD da época representada em **C**. **E** - Registros de LFP e Accel representativos de uma época de 10 segundos de sono REM. **F** - PSD da época representada em **E**. Em **A,C** e **E**, o primeiro sinal é um LFP do mPFC, o segundo, um LFP de CA1 e o terceiro, o sinal do acelerômetro. Em **B,D** e **F**, os traçados contínuos representam o PSD de CA1 e os traçados tracejados representam o PSD do mPFC. As faixas rotuladas como 'Delta' e 'Theta' indicam o início e o fim das faixas Delta e Theta no espectro de frequências do sinal, respectivamente. **G** - Exemplo representativo do espectrograma de um trecho do sinal do mPFC que apresenta os três estados do ciclo sono-vigília. **H** - O mesmo que **G**, porém, para CA1. Em **G** e **H**, a faixa amarela indica a porção do sinal que representa uma época de estado acordado, a faixa azul, uma época de sono NREM e a faixa cinza, uma época de sono REM. **I** - Hipnograma representativo referente ao trecho dos espectrogramas de **G** e **H**.



**Figura 11 - Coerência de fase e espectral entre CA1 e mPFC, acoplamento de frequência cruzada fase-amplitude em CA1 e SWRs-Delta-Spindles. A** - Exemplo representativo do coerograma de coerência de fase entre CA1 e mPFC de um trecho do sinal que apresenta os três estados do ciclo sono-vigília. **B** - O mesmo que **A**, porém, um coerograma de coerência espectral. **C** - Hipnograma representativo referente ao trecho dos coerogramas de **A** e **B**. Em **A** e **B**, a faixa amarela indica a porção do sinal que representa uma época de estado acordado, a faixa azul, uma época de sono NREM e a faixa cinza, uma época de sono REM. **D** - Comodulograma médio das épocas de sono REM de um animal representativo indicando a intensidade da modulação da amplitude das frequências da faixa de 20-200 Hz de CA1 pela fase das frequências da faixa de 4-25 Hz de CA1. **E** - O mesmo que **D**, porém, para o sono NREM. **F** - O mesmo que **D**, porém, para o estado acordado. Em **D**, **E** e **F**, a escala cor indica o índice de modulação (MI) das combinações de fase e amplitude. **G** - Exemplos representativos de ondas Delta (em vermelho), Spindles (em laranja) e SWRs (em azul) durante o sono NREM. O primeiro sinal é um LFP do mPFC, o segundo, de CA1, e o terceiro é o LFP de CA1 filtrado na faixa de 140-220 Hz.



**Figura 12** - Características das SWRs, ondas Delta e Spindles. A - Exemplo representativo do espectrograma de um trecho do sinal do mPFC que apresenta ondas Delta (d) e Spindles (s). O sinal referente a este espectrograma está disposto em branco. B - Exemplo representativo do espectrograma do mesmo trecho do sinal de A, porém de CA1, que apresenta SWRs (\*) e Ripples não acompanhadas de *sharp wave* (n-SW). O sinal bruto referente a este espectrograma está disposto em branco (superior) e o sinal filtrado na faixa de 140-220 Hz logo abaixo. C - Média do sinal bruto e filtrado das SWRs e Ripples detectadas nos registros de CA1 de cada animal. Para cada animal, o primeiro gráfico mostra a média dos sinais brutos (azul) e filtrados (laranja) das SWRs detectados. O segundo gráfico mostra a média das Ripples não acompanhadas de *sharp waves*.

### 4.3. Comparação entre dias antes e após aprendizado

Após caracterizar o registro da linha de base, comparamos a arquitetura do sono, as características espectrais, e a comunicação entre CA1 e o mPFC ao longo dos dias de aquisição no BM. Esta etapa é essencial ao entendimento da atividade de CA1 e mPFC durante o processo de consolidação de memórias no BM.

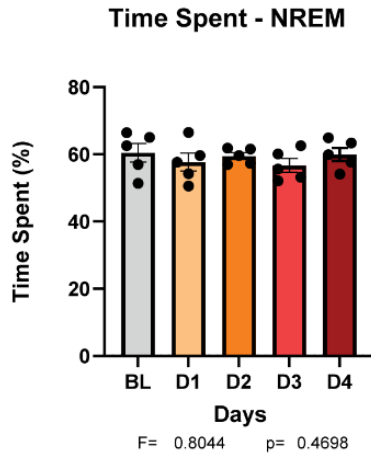
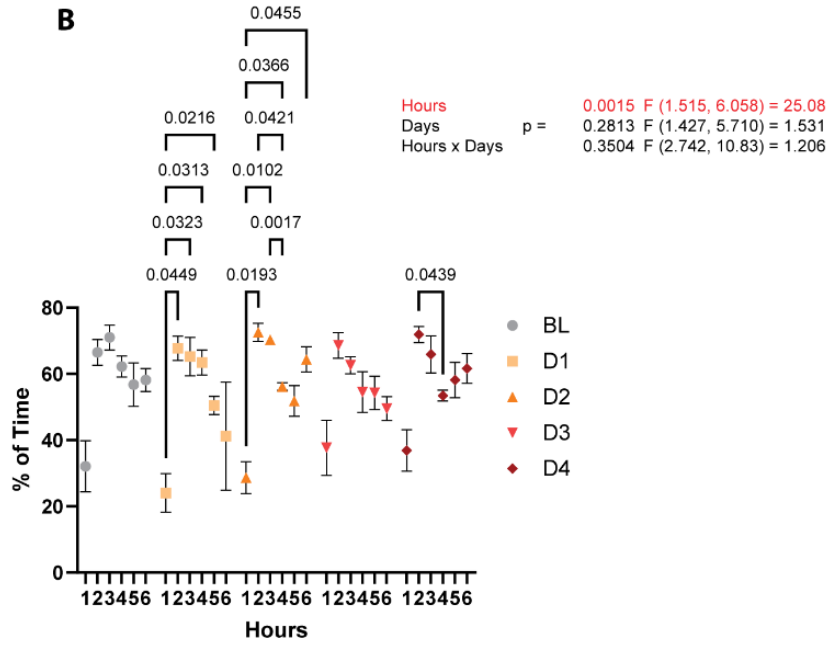
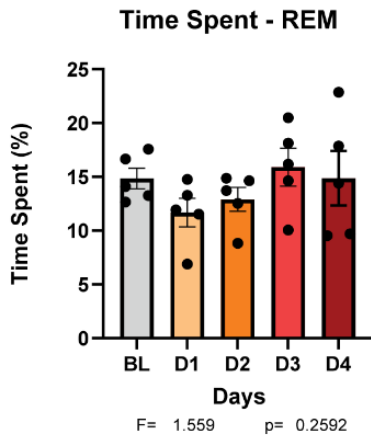
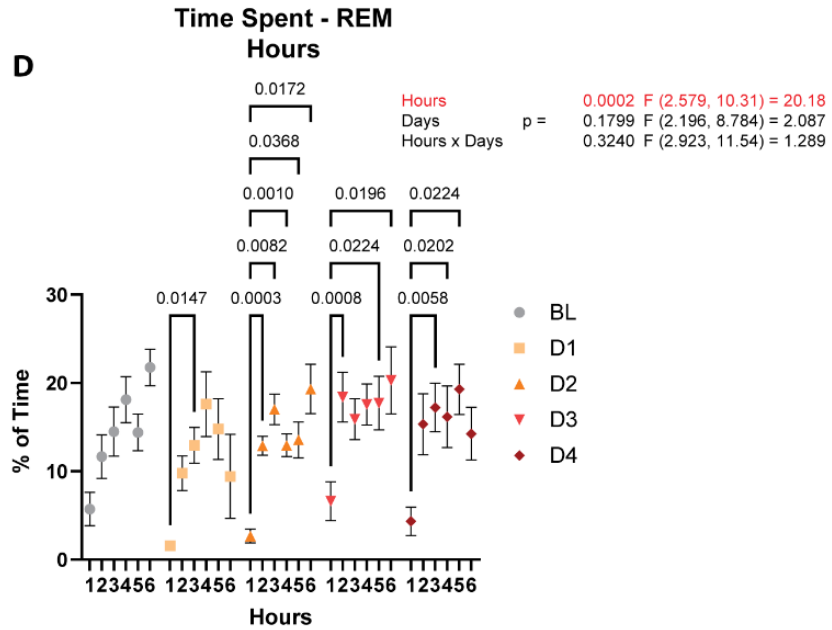
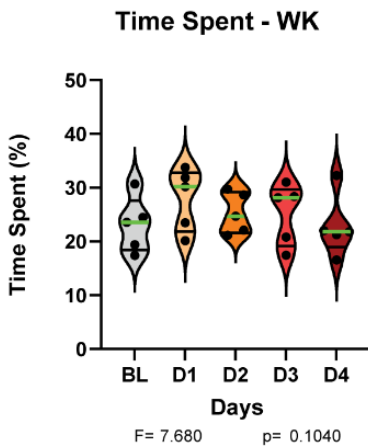
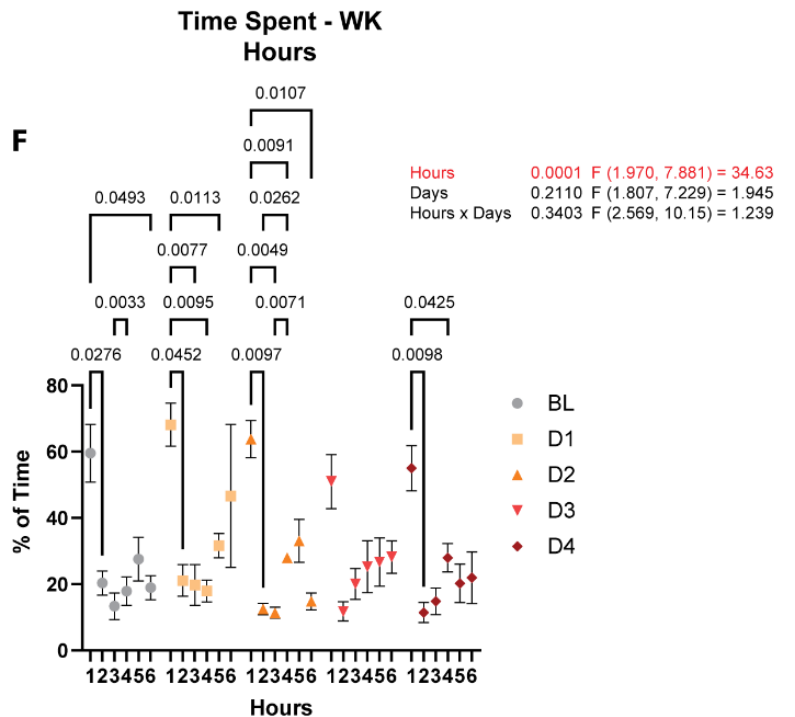
#### 4.3.1. Arquitetura do sono

##### 4.3.1.1. Tempo despendido em cada estado do ciclo sono-vigília

O aprendizado de tarefas que exigem a consolidação de memórias procedurais e declarativas está relacionado a um aumento no tempo despendido em sono NREM e REM (Smith et al. 2004; Hellman e Abel, 2007; Fogel et al. 2007; Binder et al., 2019). Desta forma, para entender o efeito do aprendizado no BM sobre a arquitetura do sono comparamos a fração do tempo total despendida em cada um dos estados do ciclo sono-vigília ao longo dos dias de aquisição no BM. Em especial, esperávamos observar um aumento no tempo despendido em REM no sono pós-aprendizado (como observado por Binder et al. 2019), porém, a porcentagem média de tempo despendido em cada um dos estados do ciclo sono-vigília não apresentou mudanças estatisticamente significativas ao longo dos dias de aquisição no BM. NREM: [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.766, 7.063) = 0.8044$ ;  $P=0.4698$ , post hoc Tukey test:  $p>0.05$ ], REM: [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(2.504, 10.02) = 1.559$ ;  $P=0.2592$ , post hoc Tukey test:  $p>0.05$ ] e WK: [Friedman statistic = 7.680;  $P=0.1040$ , Dunn's multiple comparisons test  $p>0,05$ ] (**Figura 13A, C e E**). Considerando a variação ao longo das

horas de registro em cada dia, observa-se um aumento do tempo despendido no sono NREM a partir da segunda hora de registro nos dias D1 e D2 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.515, 6.058) = 25.08$ ;  $P=0.0015$ , post hoc Tukey test (valores de  $p$  na figura)] (**Figura 13B**). Além disso, observamos um aumento do tempo despendido no sono REM ao longo das horas de registro nos dias D1-D4 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(2.579, 10.31) = 20.18$ ;  $p = 0.0002$ , post hoc Tukey test (valores de  $p$  na figura)] (**Figura 13D**). Por fim, observamos uma redução no tempo despendido no estado WK em diferentes horas do registro em comparação com a primeira hora dos dias BL, D1, D2 e D4 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.970, 7.881) = 34.63$ ;  $p = 0.0001$ , post hoc Tukey test (valores de  $p$  na figura)] (**Figura 13F**).



**A****Time Spent - NREM****C****D****E****F**

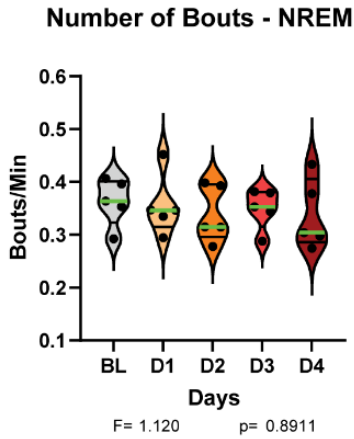
**Figura 13 - Tempo despendido em cada um dos estados do ciclo sono-vigília ao longo dos dias de registro.** **A** - Tempo médio despendido em sono NREM ao longo dos dias de registro. **B** - Tempo médio despendido em sono NREM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - O mesmo que A, porém, para REM. **D** - O mesmo que B, porém, para REM. **E** - O mesmo que A, porém, para o estado acordado. **F** - O mesmo que B, porém, para o estado acordado.

#### 4.3.1.2. Número de *bouts*

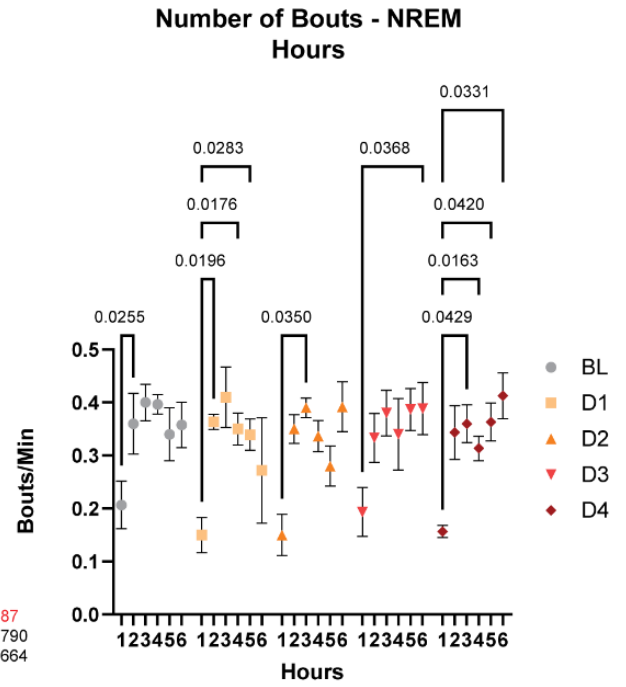
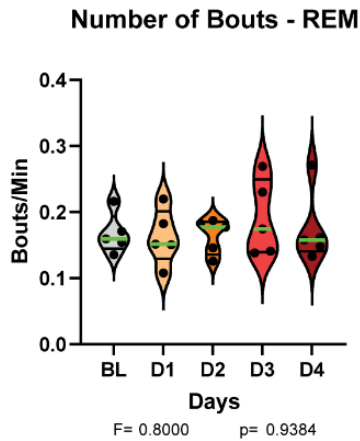
Não apenas o tempo despendido em sono NREM e REM é maior após o aprendizado, mas também há evidências que indicam que a continuidade dos períodos de sono é essencial à consolidação de memórias (Rolls et al. 2011; Djonlagic et al. 2012). Nesse sentido, quanto menos fragmentado o período de sono antes e após a aquisição de tarefas que exijam a formação de memórias procedurais e declarativas, maior o desempenho dos indivíduos (Rolls et al. 2011; Benkirane et al. 2022). Portanto, para compreender o padrão de fragmentação de sono ao longo dos dias de aquisição no BM, avaliamos o número de *bouts* de cada estado ao longo dos dias (Honda et al. 2018; Di Marco et al. 2023). Em nosso trabalho, os *bouts* foram definidos como um conjunto de épocas de 10 segundos consecutivas de um determinado estado. Nesse sentido, a nossa hipótese é que o número de *bouts* de sono NREM e REM fosse menor nos dias de aquisição no BM, uma vez que quanto menor o número de *bouts* de épocas de sono, mais estável é o sono do animal. Ainda, esperávamos observar uma redução no número de *bouts* do estado WK nos dias de aquisição no BM.

Curiosamente, o número de *bouts* de sono NREM e REM não apresentou alterações estatisticamente significativas ao longo dos dias de aquisição no BM. Entretanto, o número de *bouts* do estado WK foi maior no dia D1 quando comparado ao BL. NREM: [Friedman statistic = 1.120; P=0.8911, Dunn's multiple comparisons test: p>0.05], REM: [Friedman statistic = 0.8000; P=0.9384, Dunn's multiple comparisons test: p>0.05] e WK: [BL vs. D1 Rank Diff. = -16.00; Friedman statistic F= 13.76; P= 0.008102, Dunn's multiple comparisons test: BLvsD1 p=0.0137] (**Figura 14A, C e E**). Considerando a variação ao longo das horas de registro em cada dia, observa-se um aumento do número de *bouts* de sono NREM em comparação à primeira hora de registro em todos os dias [Mixed-effects model (REML); Horas: F (2.189, 8.758) = 14.87; P=:0.0013, post hoc Tukey test (valores de p na figura)] (**Figura 14B**). Além disso, observamos um aumento do número de *bouts* de sono REM em

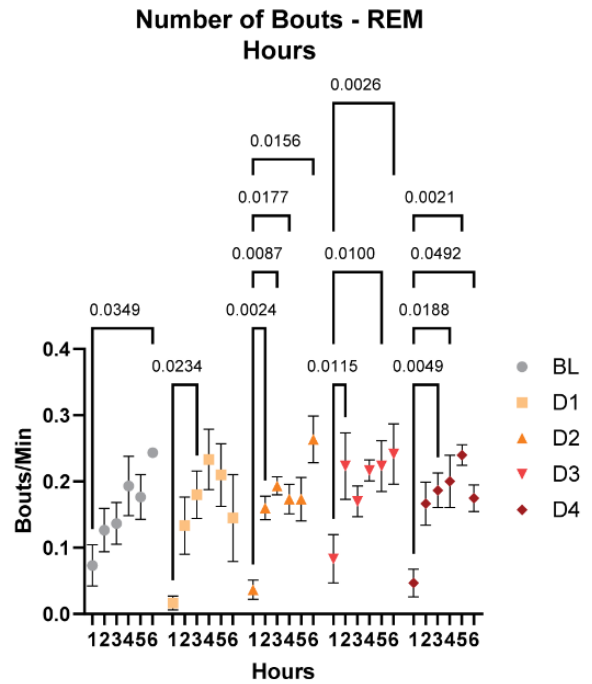
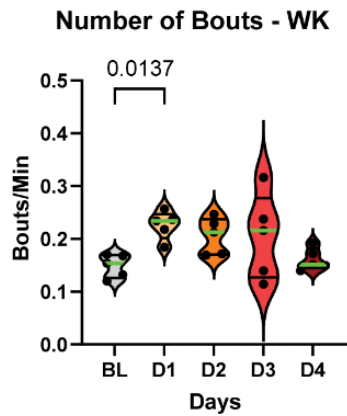
comparação à primeira hora de registro em todos os dias [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(2.551, 10.21) = 17.45$ ;  $P=0.0003$ , post hoc Tukey test (valores de p na figura)] (**Figura 14D**). Por fim, observamos uma redução do número de *bouts* no estado WK em comparação à primeira hora de registro apenas no BL [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.465, 5.860) = 6.578$ ;  $P=0.0368$ , post hoc Tukey test (valores de p na figura)] (**Figura 14F**).

**A**

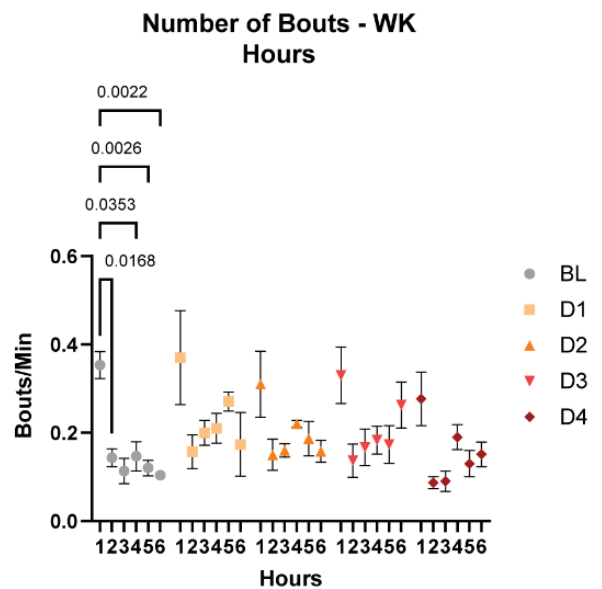
Hours    0.0013 F (2.189, 8.758) = 14.87  
 Days    0.5906 F (1.507, 6.028) = 0.4790  
 Hours x Days    0.5266 F (2.755, 10.88) = 0.7664

**B****C**

Hours    0.0003 F (2.551, 10.21) = 17.45  
 Days    0.3204 F (2.261, 9.043) = 1.312  
 Hours x Days    0.3746 F (2.874, 11.35) = 1.134

**D****E**

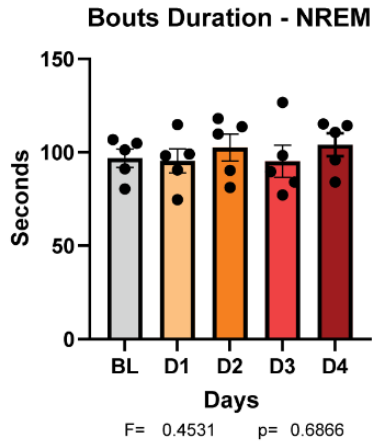
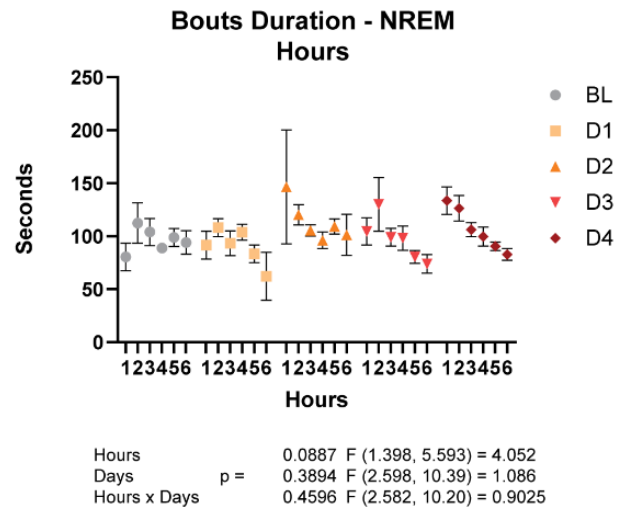
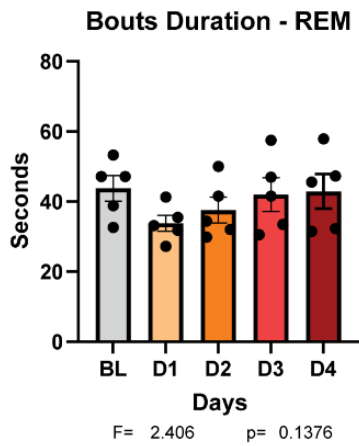
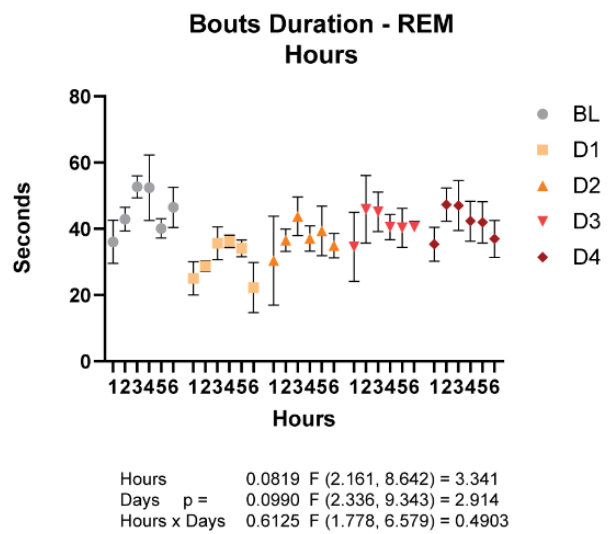
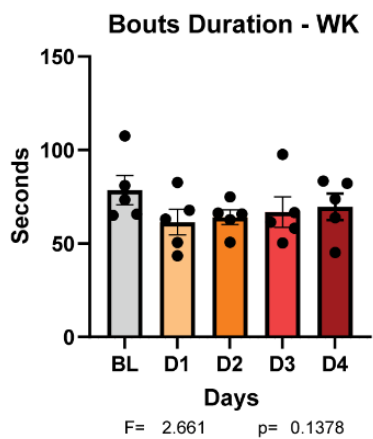
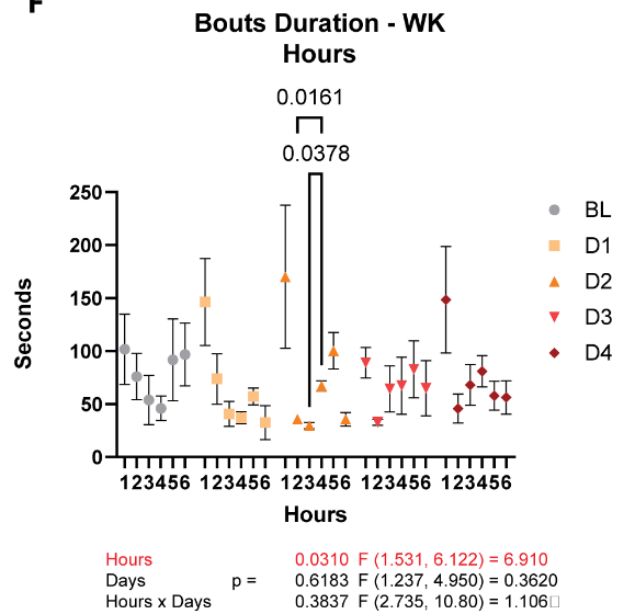
Hours    0.0368 F (1.465, 5.860) = 6.578  
 Days    0.0657 F (1.699, 6.795) = 4.313  
 Hours x Days    0.3596 F (2.610, 10.31) = 1.177

**F**

**Figura 14 - Número de *bouts* de cada um dos estados do ciclo sono-vigília ao longo dos dias de registro. A** - Número médio de *bouts* de sono NREM ao longo dos dias de registro. **B** - Número médio de *bouts* de sono NREM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - O mesmo que A, porém, para REM. **D** - O mesmo que B, porém, para REM. **E** - O mesmo que A, porém, para o estado acordado. **F** - O mesmo que B, porém, para o estado acordado.

#### 4.3.1.3. Duração de *bouts*

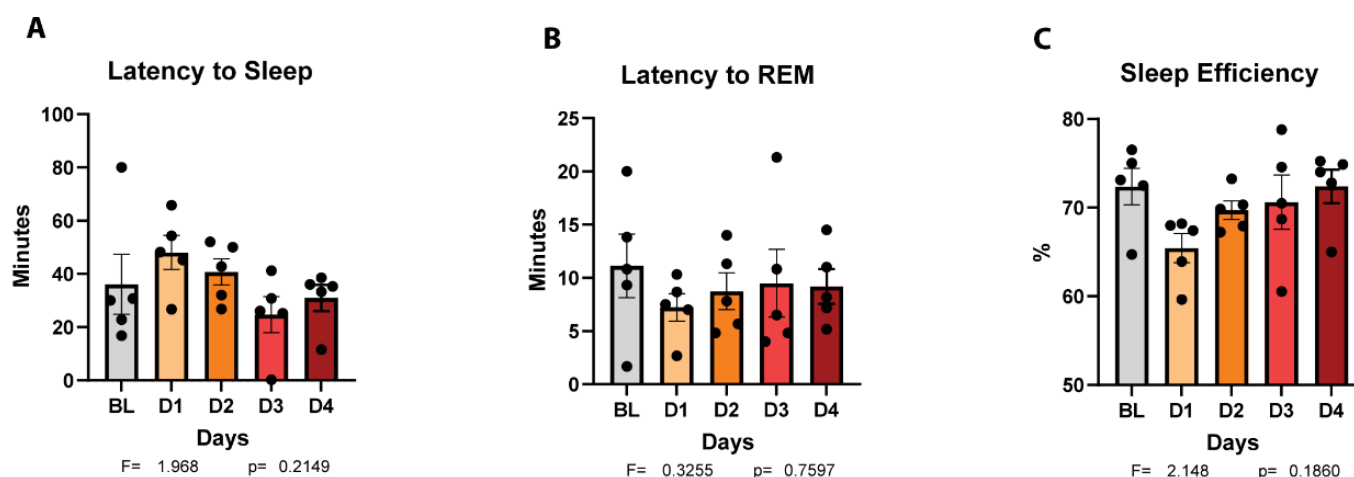
A duração dos *bouts* é um parâmetro complementar ao número de *bouts* ao estudar a fragmentação do sono (Honda et al. 2018; Di Marco et al. 2023). Dessa forma, a nossa hipótese era que os estados de sono NREM e REM apresentariam maior duração de *bouts* e o estado WK uma menor duração de *bouts* nos dias de aquisição no BM, indicando um sono mais estável. Contudo, a duração de *bouts* de sono NREM, REM e estado WK não apresentou alterações estatisticamente significativas ao longo dos dias de aquisição no BM. NREM: [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(2.468, 9.874) = 0.4531$ ;  $P=0.6866$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ], REM: [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(2.394, 9.574) = 2.406$ ;  $P=0.1376$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] e WK: [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.816, 7.262) = 2.661$ ;  $P=0.1378$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 15A, C e E**). Considerando a duração de *bouts* ao longo das horas de registro em cada dia, não houve mudanças significativas no sono NREM [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.398, 5.593) = 4.052$ ;  $P=0.0887$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 15B**) ou REM [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(2.161, 8.642) = 3.341$ ;  $P=0.0819$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 15D**). Já o estado WK apresentou um aumento na duração dos *bouts* comparando-se as horas 2, 3 e 4 do dia D2 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.531, 6.122) = 6.910$ ; (valores de p na figura)] (**Figura 15F**).

**A****B****C****D****E****F**

**Figura 15 - Duração dos *bouts* de cada um dos estados do ciclo sono-vigília ao longo dos dias de registro. A - Duração média de *bouts* de sono NREM ao longo dos dias de registro. B - Duração média de *bouts* de sono NREM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. C - O mesmo que A, porém, para REM. D - O mesmo que B, porém, para REM. E - O mesmo que A, porém, para o estado acordado. F - O mesmo que B, porém, para o estado acordado.**

#### **4.3.1.4. Latência para início do sono e eficiência do sono**

A latência para o sono NREM e sono REM é reduzida após o aprendizado (Datta, 2000; Tononi e Cirelli, 2014; Arzilli et al. 2019; Park e Weber, 2020). Isso é explicada pela SHY (Tononi e Cirelli, 2014), visto que o processo de aprendizagem promove potenciação sináptica e aumenta a pressão do sono, mas também indica que o aprendizado modula mecanismos de controle homeostático do sono REM (Park e Weber, 2020). Portanto, comparamos a latência para o início do sono e para o início do sono REM entre os dias de aquisição do BM. Além disso, avaliamos também a eficiência do sono, visto que ela é um indicativo da qualidade do sono dos animais (Reed e Sacco, 2016). A latência para sono, latência para o sono REM e a eficiência do sono não apresentaram mudanças estatisticamente significativas ao longo dos dias de aquisição no BM. Latência para o sono: [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.591, 6.395) = 1.968$ ;  $P=0.2149$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 16A**), latência para o sono REM: [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(2.322, 9.289) = 0.3255$ ;  $P=0.7597$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 16B**) e eficiência do sono: [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.811, 7.245) = 2.148$ ;  $P=0.1860$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 16C**).



**Figura 16 - Latência para o sono e eficiência do sono ao longo dos dias de registro. A - Latência para o sono média ao longo dos dias de registro. B - Latência para o sono REM média ao longo dos dias de registro. C - Eficiência do sono média ao longo dos dias de registro.**

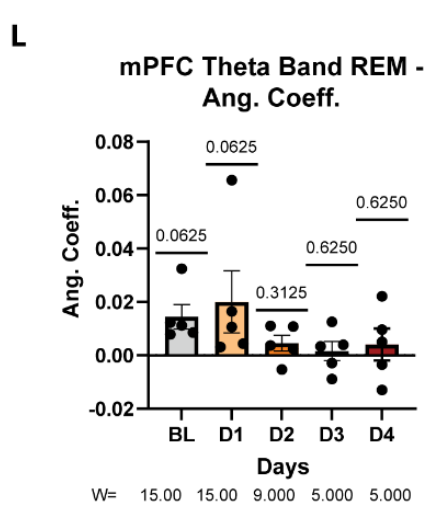
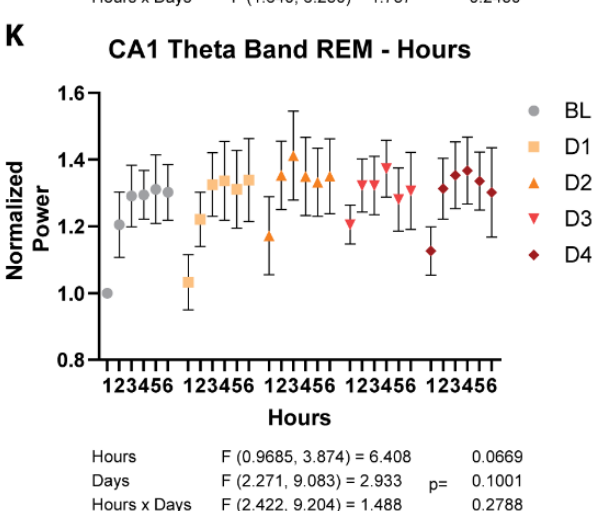
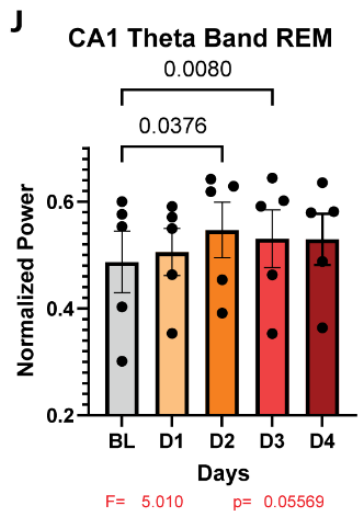
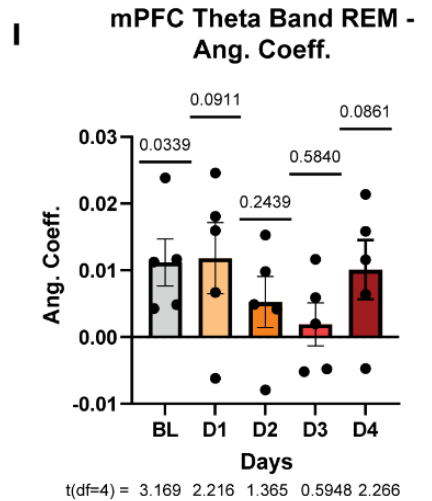
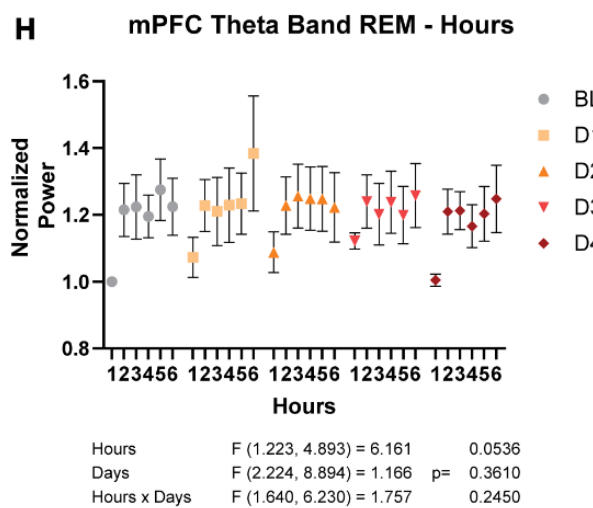
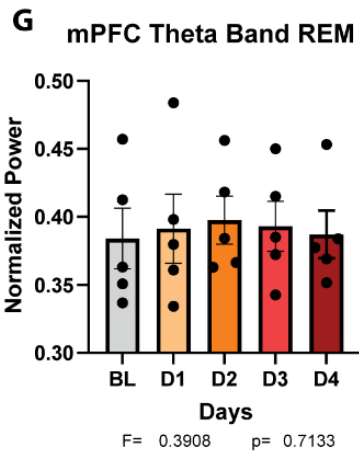
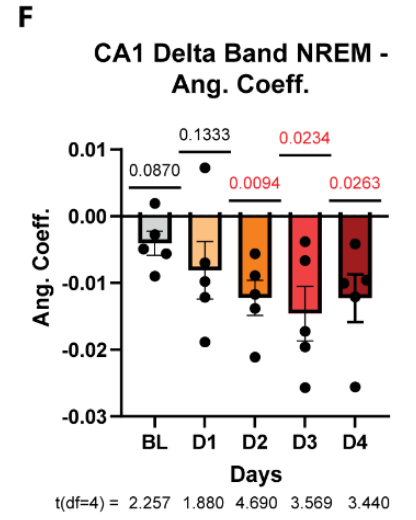
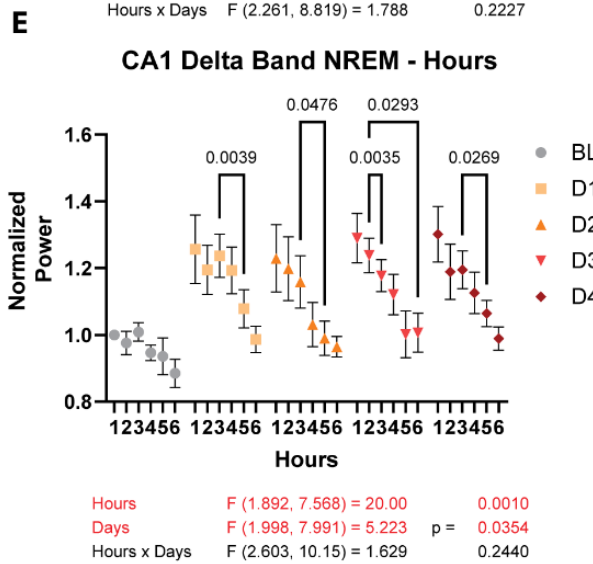
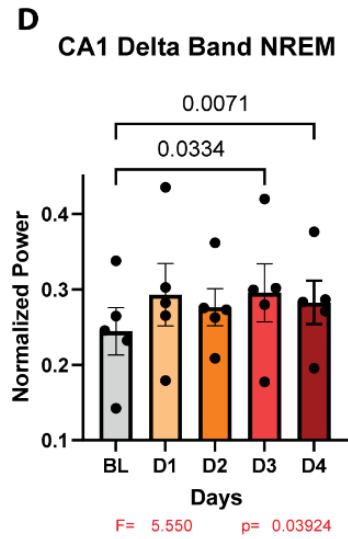
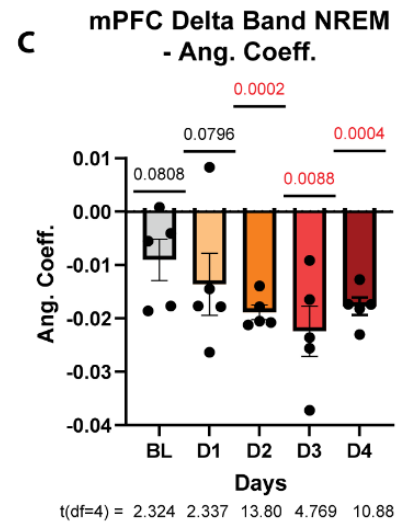
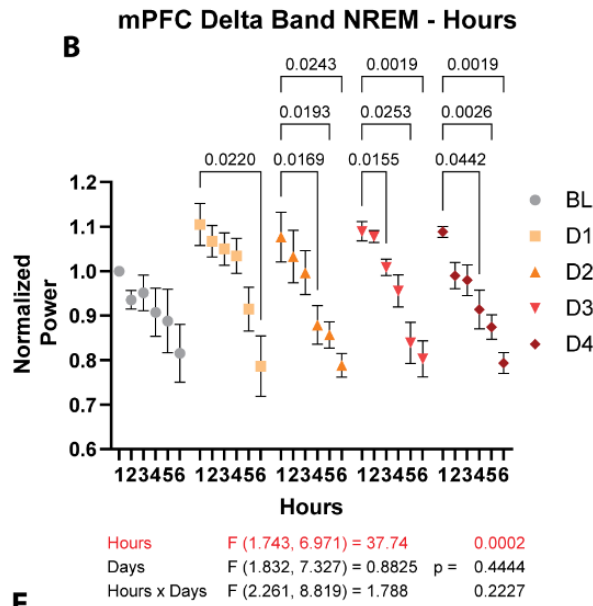
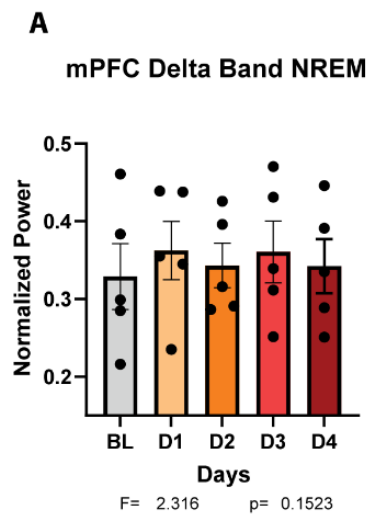
#### 4.3.2. Densidade espectral de potência (PSD)

O processo de aprendizado gera potenciação sináptica nas redes neocorticais e hipocampais (Roman et al. 1987; Brown et al. 1988; Bliss e Collingridge, 1993; Rioult-Pedotti et al. 2000; Whitlock et al. 2006). Além disso, segundo a SHY, este aumento na força sináptica nas redes neurais está associado a um aumento da atividade de ondas lentas durante o sono NREM subsequente ao aprendizado (Tononi e Cirelli, 2014). Portanto, para testar se a atividade de ondas lentas é aumentada após o aprendizado no BM, avaliamos a densidade espectral de potência dos sinais do mPFC e CA1. Para comparar os dias, consideramos apenas as 3 primeiras horas de registro para o sono NREM. Nesse caso, não observamos mudanças estatisticamente significativas na potência média da faixa de Delta durante o sono NREM ao longo dos dias no mPFC [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(2.231, 8.924) = 2.316$ ;  $P=0.1523$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 17A**). Contudo, encontramos um aumento de Delta em CA1 nos dias D3 e D4 em comparação com o BL [Mean diff: BL vs. D3:  $-0.05181$ ; BL vs. D4:  $-0.04461$ ; RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(2.062, 8.247) = 6.770$ ,  $P=0.0178$ , post hoc Tukey test: BL vs. D3:  $p=0.0377$ ; BL vs. D4:  $p=0.0262$ ] (**Figura 17D**). Ao longo das horas de registro, observamos reduções gradativas na potência de Delta no mPFC (Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.743, 6.971) = 37.74$ ;  $P=0.0002$ , post hoc Tukey test (valores de p na figura)) e em CA1 (Mixed-effects model (REML);



Horas:  $F(1.892, 7.568) = 20.00$ ;  $P=0.0010$ , post hoc Tukey test (valores de  $p$  na figura)) (**Figura 17B e E**). Ainda, para CA1, o modelo de efeito misto (REML) indicou a existência de diferenças significativas entre os dias, apesar do teste post hoc não ter conseguido revelar tais diferenças (Mixed-effects model (REML); Dias:  $F(1.998, 7.991) = 5.223$ ;  $P=0.0354$ , post hoc Tukey test (valores de  $p$  na figura)) (**Figura 17E**). Por fim, o cálculo do coeficiente angular da potência de Delta ao longo das horas indica a existência de uma tendência de queda da potência de Delta nos dias D2, D3 e D4 no mPFC e CA1 (One-sample t-test; média esperada = 0; resultados estatísticos na figura) (**Figura 17C e F**).

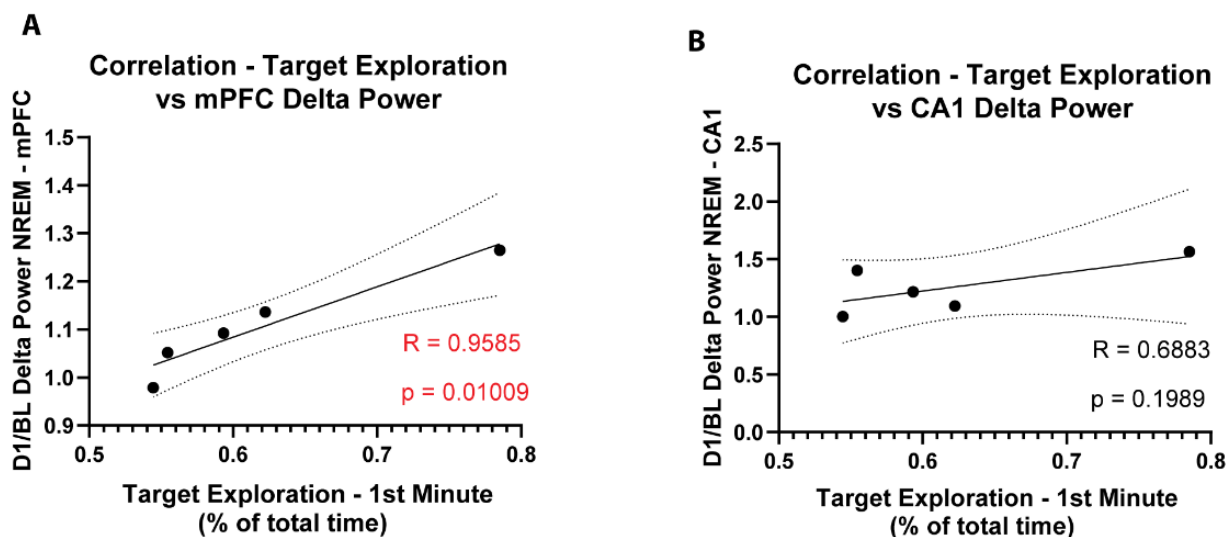
Durante o processo de aquisição de informações espaciais as oscilações Teta modulam a atividade das *places cells* hipocámpais (Drieu e Zugaro, 2019) e posteriormente, durante o sono REM, elas estão associadas à reativação das representações neurais relacionadas às *place cells* que estiveram ativas durante a aquisição (Poe et al. 2000; Louie e Wilson, 2001; Almeida-Filho et al. 2018). De fato, a atividade de Teta é importante para o processo de consolidação de memórias declarativas durante o sono (Fogel et al. 2007; Boyce et al. 2016). Portanto, para testar se a atividade em Teta é aumentada após o aprendizado no BM, avaliamos a densidade espectral de potência dos sinais do mPFC e CA1. Para comparar os dias, consideramos apenas as 3 últimas horas de registro para o sono REM. Nesse caso, não observamos mudanças estatisticamente significativas na potência média de Teta em REM no mPFC [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(2.291, 9.162) = 0.3908$ ;  $P=0.7133$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 17G**). Contudo, observamos um aumento da potência em Teta em CA1 nos dias D2 e D3 em comparação com o BL [BL vs. D2:  $-0,06005$ ; BL vs. D3:  $-0,04383$ ; RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.557, 6.229) = 5.010$ ;  $P=0.0557$ , post hoc Tukey test: BL vs. D2  $p= -0,0376$ ; BL vs. D3  $p= -0,0080$ ] (**Figura 17J**). Ao longo das horas de registro, não observamos variações na potência média de Teta no mPFC em nenhum dos dias [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.223, 4.893) = 6.161$ ;  $P=0.0536$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ]. Da mesma forma, não houve mudanças na potência média de Teta ao longo das horas em CA1 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(0.9685, 3.874) = 6.408$ ;  $P=0.0669$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 17B e E**). O cálculo do coeficiente angular da potência de Teta ao longo das horas indica a existência de uma tendência de aumento da potência no BL no mPFC, mas não em CA1 (One-sample t-test; média esperada = 0; resultados estatísticos na figura) (**Figura 17I e L**).



**Figura 17 - Potência das bandas Delta (NREM) e Teta (REM) no mPFC e CA1 ao longo dos dias de registro.** **A** - Potência média da banda Delta no mPFC durante o sono NREM ao longo dos dias de registro. **B** - Potência média da banda Delta no mPFC durante o sono NREM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - Coeficiente angular médio da variação da potência da banda Delta no mPFC durante o sono NREM ao longo das horas em cada um dos dias de registro. **D** - O mesmo que A, porém, para CA1. **E** - O mesmo que B, porém, para CA1. **F** - O mesmo que C, porém, para CA1. **G** - Potência média da banda Teta no mPFC durante o sono REM ao longo dos dias de registro. **H** - Potência média da banda Teta no mPFC durante o sono REM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **I** - Coeficiente angular médio da variação da potência da banda Teta no mPFC durante o sono REM ao longo das horas em cada um dos dias de registro. **J** - O mesmo que **G**, porém, para CA1. **K** - O mesmo que **H**, porém, para CA1. **L** - O mesmo que **I**, porém, para CA1.

Por fim, tentamos encontrar uma evidência da relevância da potência de Delta em NREM e a potência de Teta em REM como marcadores eletrofisiológicos da consolidação de memórias no BM. Portanto, consideramos dois parâmetros principais: 1 - a razão da potência média de Delta do mPFC em NREM na primeira hora do D1 pela potência média de Delta do mPFC em NREM na primeira hora do BL; 2 - o mesmo, porém, para CA1. Para isso, utilizamos a correlação de Pearson para indicar a correlação linear entre os parâmetros em questão e o tempo de exploração da região alvo no primeiro minuto no dia de teste no BM. Observamos uma forte correlação positiva entre a razão da potência de Delta do mPFC em NREM na primeira hora (D1/BL) e o tempo total de exploração da região alvo no primeiro minuto no dia de teste no BM ( $R = 0.9585$ ,  $p = 0.01009$ ) (**Figura 18A**). Entretanto, não observamos essa mesma correlação positiva para a potência de Delta em CA1 ( $R = 0.6883$ ,  $p = 0.1989$ ) (**Figura 18B**).

**Figura 18 - Correlação entre a potência de Delta e a eficácia da consolidação da memória.** **A** - Correlação de Pearson entre a exploração do quadrante alvo no primeiro minuto da sessão de teste e



a razão entre potência de Delta no mPFC na primeira hora do dia D1 pela potência de Delta no mPFC na primeira hora do dia BL. **B** - O mesmo que **A**, porém, para a potência de Delta em CA1.

#### 4.3.3. Coerência de Fase CA1-mPFC

A conectividade funcional entre CA1 e o mPFC é aumentada durante períodos de tomada de decisão quando animais se locomovem em labirintos (Jones e Wilson, 2005; Benchenane et al. 2010; Sigurdsson et al., 2010; O'Neill et al., 2013; Tavares e Tort, 2022). Além disso, há evidências que indicam um aumento da conectividade entre estas duas regiões durante o período de sono após a aquisição de memórias contextuais aversivas e da aprendizagem da tarefa objeto-espaco (Popa et al. 2010; Lobato et al. 2023). Portanto, para entender a comunicação CA1-mPFC durante o sono pós-aprendizado no BM, avaliamos a coerência de fase das bandas Delta (em NREM) e Teta (em REM) entre CA1 e o mPFC ao longo dos dias de aquisição da tarefa. Este tipo de análise gera resultados quantitativos acerca da conectividade funcional entre as regiões de interesse (Lachaux et al. 1999). Para a coerência de fase da banda Delta em NREM consideramos as três primeiras horas de registro de cada dia. Já para Teta em REM, consideramos as três últimas horas de registro.

A coerência de fase em Delta durante o sono NREM não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os dias de registro [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.606, 6.425) = 0.61850$ ;  $P=0.5345$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 19A**). Da

mesma forma, a coerência de fase em Delta durante o sono NREM não apresentou diferenças estatisticamente significativas ao longo das horas de registro [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(0.8965, 3.586) = 2.313$ ;  $P=0.2074$  post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 19B**).

A coerência de fase em Teta durante o sono REM não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os dias de registro [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.497, 5.988) = 0.9221$ ;  $P=0.4182$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 19C**). Além disso, a coerência de fase em Teta durante o sono REM não apresentou diferenças estatisticamente significativas ao longo das horas de registro [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(0.8101, 3.240) = 1.013$ ;  $P=0.3590$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 19D**).

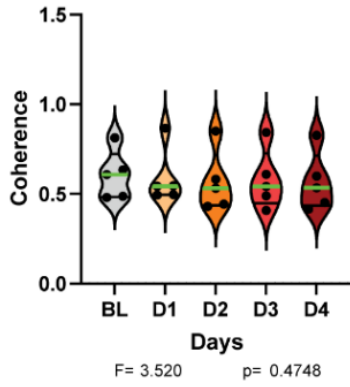
#### 4.3.4. Coerência Espectral CA1-mPFC

Semelhantemente à análise da coerência de fase, a coerência espectral é um indicativo da conectividade funcional entre regiões (Bowyer, 2016). Portanto, visando ter mais uma evidência sobre a dinâmica de comunicação entre CA1 e o mPFC, avaliamos a coerência espectral de faixas de frequências entre estas regiões durante o sono.

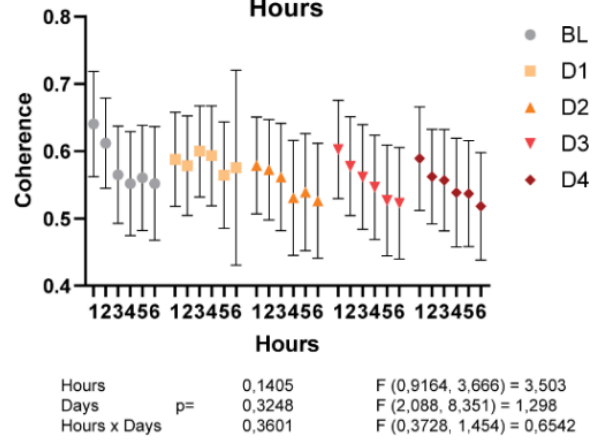
A coerência espectral em Delta durante o sono NREM não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os dias de registro [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.384, 5.534) = 0.5501$ ;  $P=0.5444$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 19E**). Ainda, a coerência espectral em Delta durante o sono NREM não apresenta diferenças estatisticamente significativas ao longo das horas de registro [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(0.8721, 3.488) = 3.788$ ;  $P=0.1331$  post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 19F**).

A coerência espectral em Teta durante o sono REM não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os dias de registro [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.891, 7.563) = 0.4457$ ;  $P=0.6458$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 19G**). Além disso, a coerência espectral durante o sono REM não apresenta diferenças estatisticamente significativas ao longo das horas de registro [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(0.8627, 3.451) = 1.063$ ;  $P=0.3534$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 19H**).

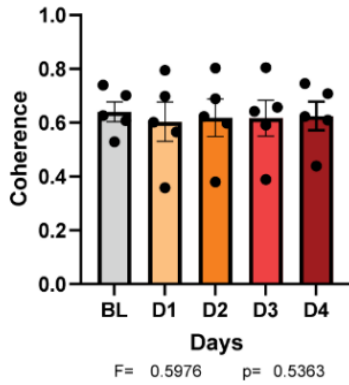
**A** Phase Coherence Delta NREM



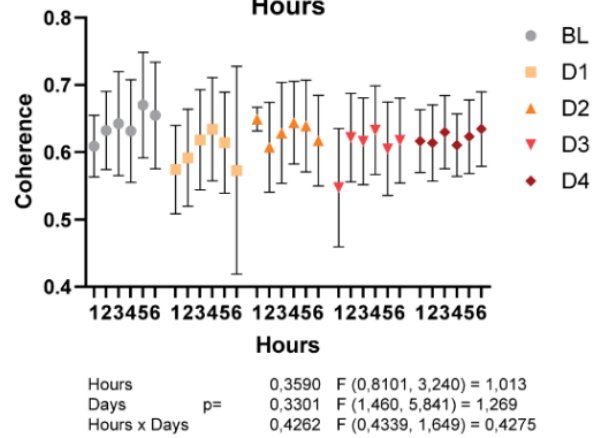
**B** Phase Coherence Delta NREM Hours



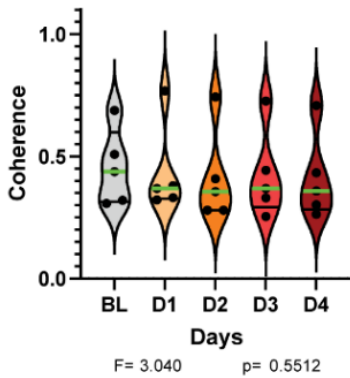
**C** Phase Coherence Theta REM



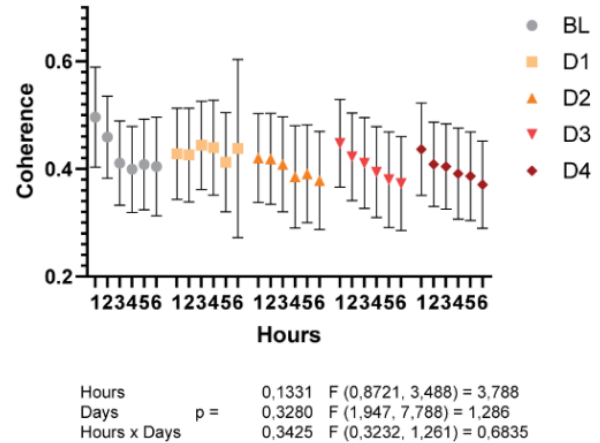
**D** Phase Coherence Theta REM Hours



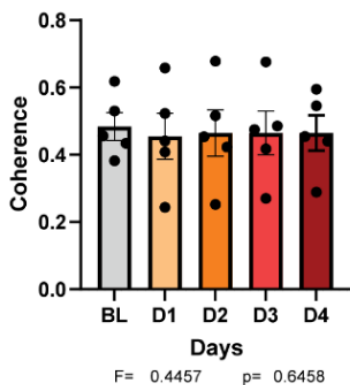
**E** Spectral Coherence Delta NREM



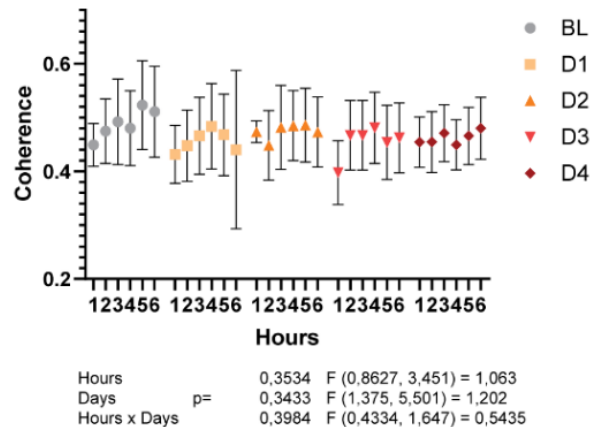
**F** Spectral Coherence Delta NREM Hours



**G** Spectral Coherence Theta REM



**H** Spectral Coherence Theta REM Hours



**Figura 19 - Coerência de fase e coerência espectral entre CA1 e mPFC nas bandas Delta (NREM) e Teta (REM) ao longo dos dias de registro. A** - Coerência de fase média da banda Delta durante o sono NREM ao longo dos dias de registro. **B** - Coerência de fase média da banda Delta durante o sono NREM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - Coerência de fase média da banda Teta durante o sono REM ao longo dos dias de registro. **D** - Coerência de fase média da banda Teta durante o sono REM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **E** - O mesmo que **A**, porém, relativo à coerência espectral. **F** - O mesmo que **B**, porém, relativo à coerência espectral. **G** - O mesmo que **D**, porém, relativo à coerência espectral. **H** - O mesmo que **E**, porém, relativo à coerência espectral.

#### 4.3.5. Sharp wave-ripples

As SWRs hipocampais são marcadores eletrofisiológicos do processo de consolidação de memórias (Buzsáki, 2015; Girardeau e Lopes-Dos-Santos, 2021), estando associadas à reativação de representações neurais e promoção de plasticidade sináptica em redes hipocampais e neocorticais (Sadowski et al. 2016; Norimoto et al. 2018; Tang e Jadhav, 2019). Nesse sentido, sabe-se que não apenas a ocorrência (Eschenko et al. 2008; Ramadan et al. 2009; Girardeau et al. 2014; Norimoto et al. 2018; Binder et al. 2019, Meier et al. 2020, Schmidt et al. 2021), mas também a amplitude e a duração média destes eventos é aumentada durante a aquisição da tarefa e durante o sono NREM subsequente ao aprendizado (Eschenko et al. 2008; Bilkey et al., 2017; Meier et al. 2020; Landeck et al. 2021). Dessa forma, testamos se a ocorrência, amplitude e duração média das SWRs seria aumentada no sono NREM como consequência ao aprendizado no BM. Nesse caso, para comparar a média destes parâmetros ao longo dos dias, utilizamos apenas as três primeiras horas de registro.

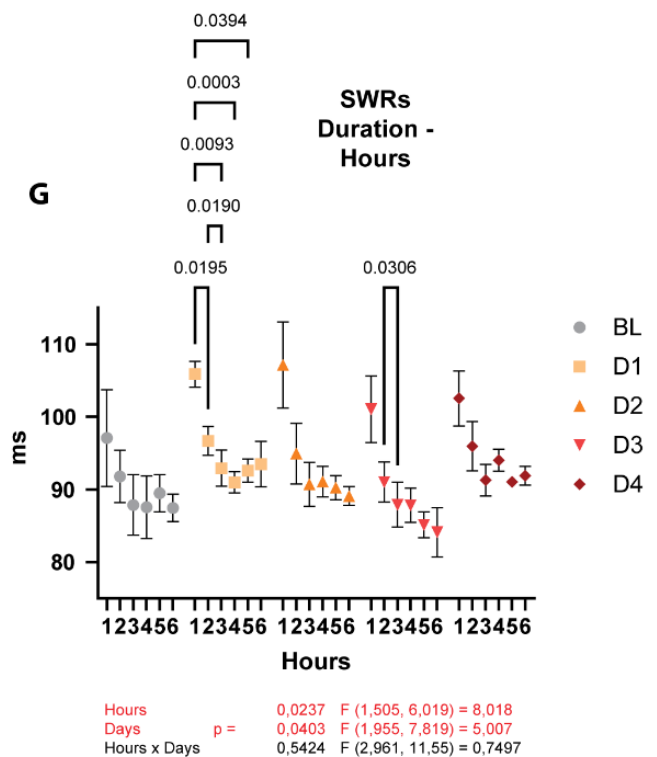
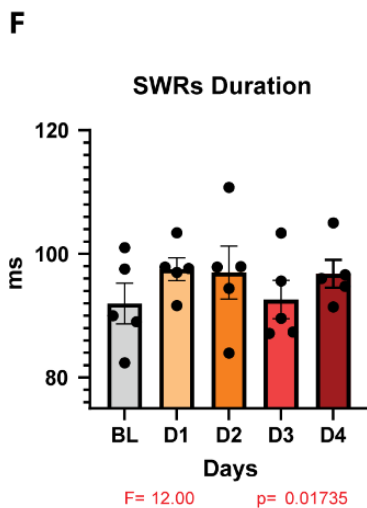
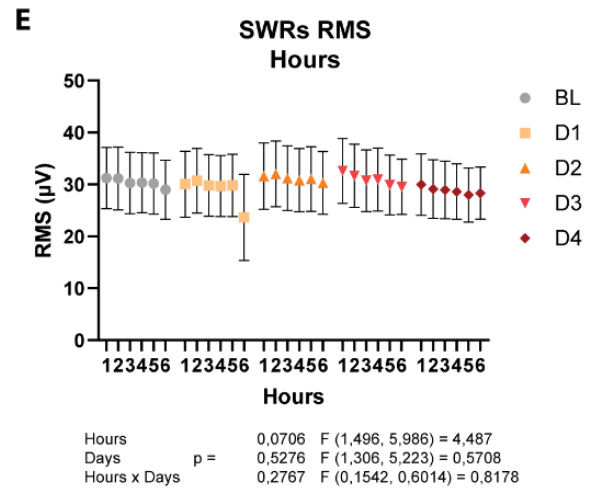
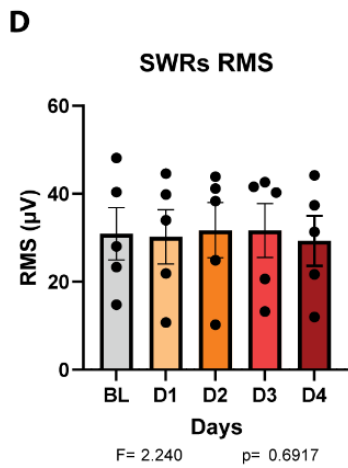
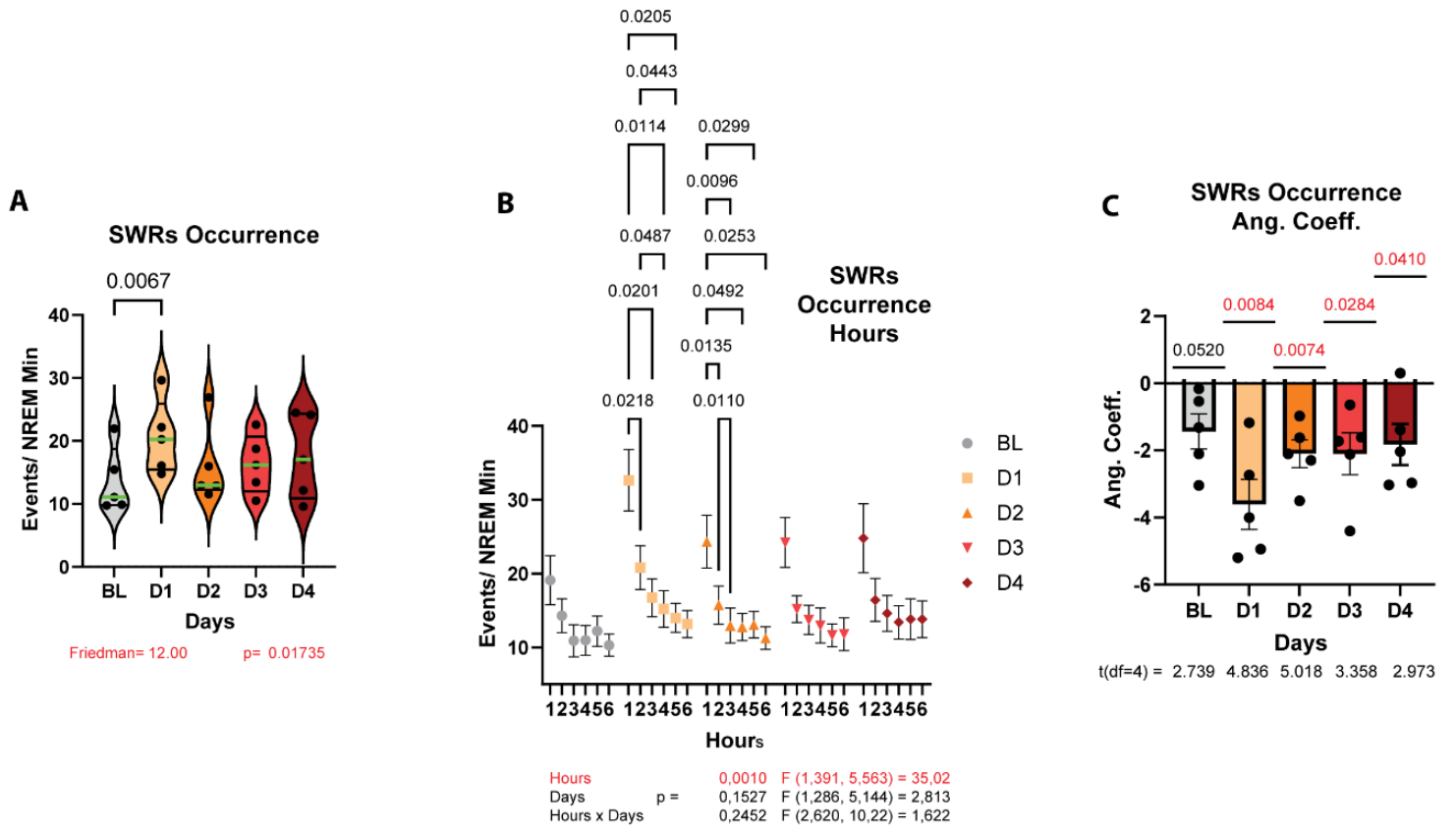
Ao avaliar a ocorrência de SWRs hipocampais ao longo dos dias de aquisição no BM, observamos um aumento estatisticamente significativo da ocorrência de SWRs no D1 em comparação com o dia BL [Friedman statistic  $F= 12.00$ ;  $P= 0.0174$ , Dunn's multiple comparisons test:  $p>0.05$ ] (**Figura 20A**). Além disso, ao comparar a ocorrência de SWRs ao longo das horas de registro, há uma redução do número de eventos por minuto de sono NREM em comparação à primeira hora de registro, mas também em relação à segunda hora nos dias D1 e D2 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.391, 5.563) = 35.02$ ;  $P=0.0010$ , (valores de  $p$  na figura)] (**Figura 20B**). O cálculo do coeficiente angular corrobora a tendência de queda na ocorrência de SWRs

nos dias D1 e D2, mas também indica uma tendência de queda nos dias D3 e D4 (One-sample t-test; média esperada = 0; resultados estatísticos na figura) (**Figura 20C**).

Ainda, não encontramos nenhuma variação do RMS médio dos eventos ao longo dos dias [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.732, 6.928) = 3.817$ ;  $P=0.0799$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 20D**) e nem ao longo das horas de registro [RM Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.391, 5.563) = 35.02$ ;  $P=0.0010$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 20E**).

O teste Anova de uma via de medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significativas na duração média das SWR ao longo dos dias, contudo, o teste post hoc não foi capaz de detectar entre quais dias essa diferença se encontra [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(2.401, 9.604) = 3.527$ ;  $P=0.0652$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 20F**). Observamos uma queda estatisticamente significativa na duração média das SWR ao longo das horas nos dias D1 e D3 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $p=0.0237$ ,  $F(1.505, 6.019) = 8.018$ , post hoc Tukey test, (valores de  $p$  na figura)]. Tal queda ocorre especialmente em comparação à primeira hora do dia D1 e em comparação às horas 2 e 3 do dia D3 (**Figura 20G**).



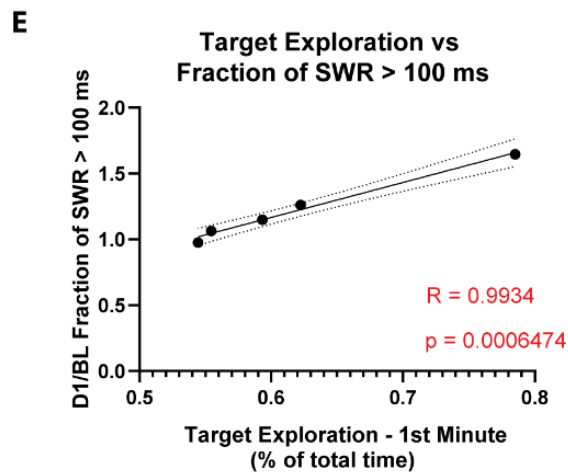
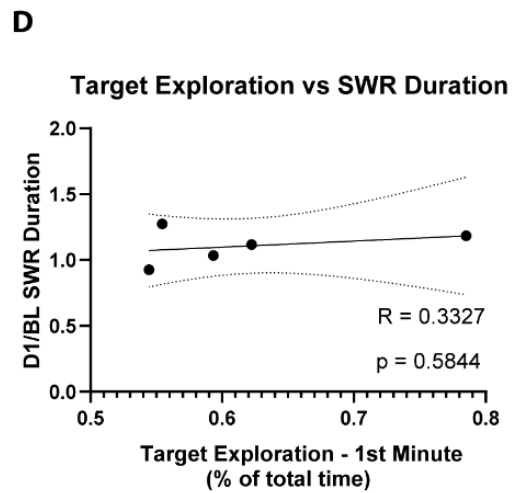
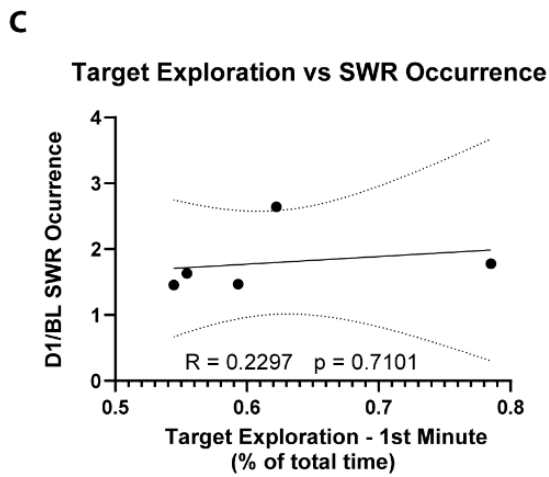
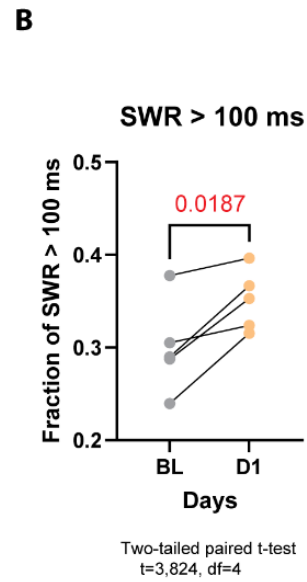
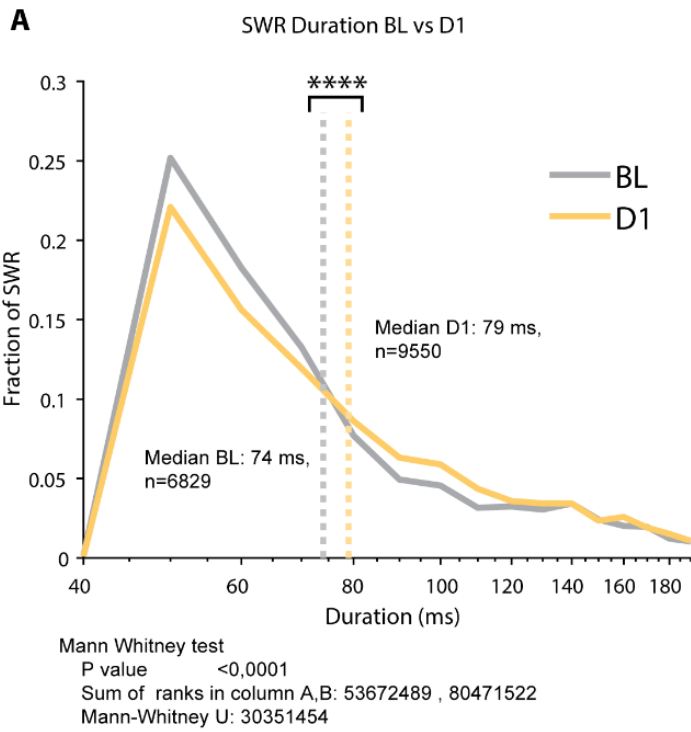


**Figura 20 - Características das SWRs ao longo dos dias de registro.** **A** - Ocorrência média de SWRs ao longo dos dias de registro. **B** - Ocorrência média de SWRs ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - Coeficiente angular médio da variação da ocorrência de SWRs ao longo das horas em cada um dos dias de registro. **D** - RMS médio das SWRs ao longo dos dias de registro. **E** - RMS médio das SWRs ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **F** - Duração média de SWRs ao longo dos dias de registro. **G** - Duração média de SWRs ao longo das horas dos diferentes dias de registro.

Ao comparar as distribuições de duração das SWRs encontramos um aumento estatisticamente significativo na duração das SWRs no D1 em relação ao BL (Mann Whitney test U: 30351454, Sum of ranks BL,D1: 53672489 , 80471522,  $p < 0,0001$ ) (**Figura 21A**). Este aumento na duração das SWRs no dia D1 também é visto ao comparar a fração de SWRs com duração maior que 100 ms (Two-tailed paired t-test,  $t=3,824$ ,  $df=4$ ,  $p = 0.0187$ ) (**Figura 21B**).

Por fim, para testar a relevância da ocorrência de SWRs e suas características como marcadores eletrofisiológicos do processo de consolidação de memórias no BM, computamos 3 razões. A saber, 1 - a razão da ocorrência de SWRs em NREM na primeira hora do D1 pela ocorrência de SWRs em NREM na primeira hora do BL; 2 - a razão da duração de SWRs em NREM na primeira hora do D1 pela duração de SWRs em NREM na primeira hora do BL; 3 - a razão da fração de SWRs com duração maior que 100 ms na primeira hora do D1 pela primeira hora do BL. Posteriormente, extraímos a relação linear entre as razões em questão e o tempo total de exploração da região alvo no primeiro minuto no dia de teste no BM, o principal índice de desempenho dos animais na tarefa.

O cálculo da correlação de Pearson não indicou uma tendência de correlação entre a razão da ocorrência de SWRs (1) e o desempenho do animal no teste do BM ( $R = 0.2297$ ,  $p = 0.7101$ ) (**Figura 21C**). Da mesma forma, a razão da duração de SWRs (2) na primeira hora do D1 em relação ao BL não apresentou uma tendência de correlação com o desempenho do animal no teste do BM ( $R = 0.3327$ ,  $p = 0.5844$ ) (**Figura 21D**). Contudo, encontramos uma alta correlação positiva entre a razão da fração de SWRs com duração maior que 100 ms (3) e o desempenho dos animais na tarefa ( $R = 0.9934$ ,  $p = 0.0006474$ ) (**Figura 21E**).



**Figura 21 - Fração das SWRs com duração maior que 100 ms e correlação entre as características das SWRs e a eficácia da consolidação da memória. A** - Comparação das distribuições de duração das SWRs entre os dias BL e D1. **B** - Comparação da fração média de SWRs com duração maior que 100 ms entre os dias BL e D1. **C** - Correlação de Pearson entre a exploração do quadrante alvo no primeiro minuto da sessão de teste e a razão entre a ocorrência de SWRs na primeira hora do dia D1 pela primeira hora do dia BL. **D** - Correlação de Pearson entre a exploração do quadrante alvo no primeiro minuto da sessão de teste e a razão entre a duração das SWRs na primeira hora do dia D1 pela primeira hora do dia BL. **E** - Correlação de Pearson entre a exploração do quadrante alvo no primeiro minuto da sessão de teste e a razão entre a fração de SWRs com duração maior que 100 ms na primeira hora do dia D1 pela primeira hora do dia BL.

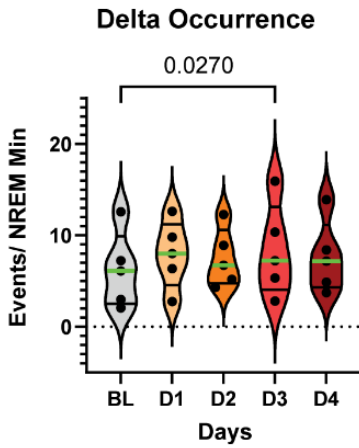
#### 4.3.6. Ondas Delta

Ondas Delta são eventos eletrofisiológicos associados a computações neurais relevantes à consolidação de memórias (Marshall et al., 2006; Ngo et al., 2013; Lustenberger et al., 2016; Miyamoto and Murayama, 2016; Todorova e Zugaro, 2019). Em especial, existem evidências que indicam a relevância das ondas Delta para o processo de consolidação de memórias declarativas (Maingret et al. 2016; Todorova e Zugaro, 2019) e à renormalização sináptica, como proposto pela SHY (Tononi e Cirelli, 2003, 2006, 2014). Nesse sentido, já foi observado um aumento na ocorrência e na amplitude de ondas Delta no mPFC no sono pós-aprendizado no BM (Binder et al. 2019). Portanto, tentamos confirmar se o aprendizado no BM modifica o padrão de ocorrência, a amplitude e duração média dos eventos de onda Delta no mPFC. Avaliamos a ocorrência de ondas Delta no mPFC considerando o número de eventos por minuto de sono NREM durante as três primeiras horas de registro de cada dia. Nesse caso, observamos um aumento estatisticamente significativo da ocorrência de ondas Delta no D3 em comparação com o dia BL [BL vs. D3 Rank Diff. = -15.00; Friedman statistic  $F= 10.72$ ;  $P= 0.0299$ , Dunn's multiple comparisons test: BLvsD3:  $p=0.0270$ ] (**Figura 22A**). Além disso, ao comparar a ocorrência de ondas Delta ao longo das horas de registro, há uma redução do número de eventos por minuto de sono NREM nas horas finais do registro em comparação à primeira hora e segunda horas de registro nos dias D2 e D4 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F (1.807, 7.226) = 18.46$ ;  $P= 0.00160$ , post hoc Tukey test (valores de  $p$  na figura)] (**Figura 22B**). Ainda, observamos um aumento na ocorrência de ondas Delta no mPFC no dia D1

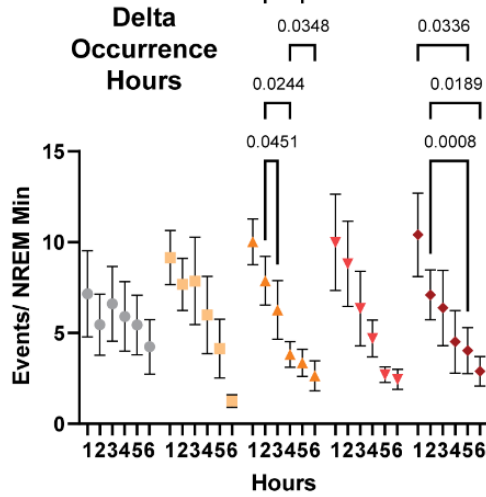
em relação ao BL (Mean of differences: 1,731; Two-tailed Paired t-test  $t=2,855$ ,  $df=4$ ) (**Figura 22C**).

Analisamos a duração média das ondas Delta. O teste Anova de uma via não foi capaz de detectar uma diferença estatisticamente significativa na duração média das ondas Delta ao longo dos dias [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.942, 7.768) = 2.082$   $P=0.1890$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 22D**). De forma semelhante, não observamos diferenças estatisticamente significativa na duração média das ondas Delta ao longo das horas em nenhum dos dias [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.743, 6.970) = 3.069$ ;  $P=0.1139$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 22E**).

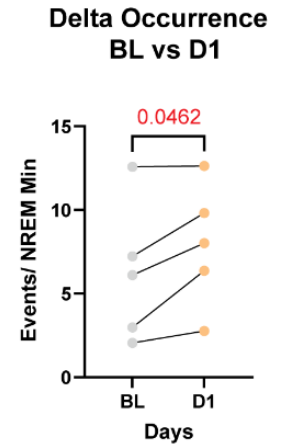
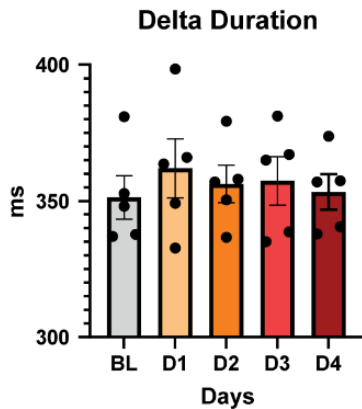
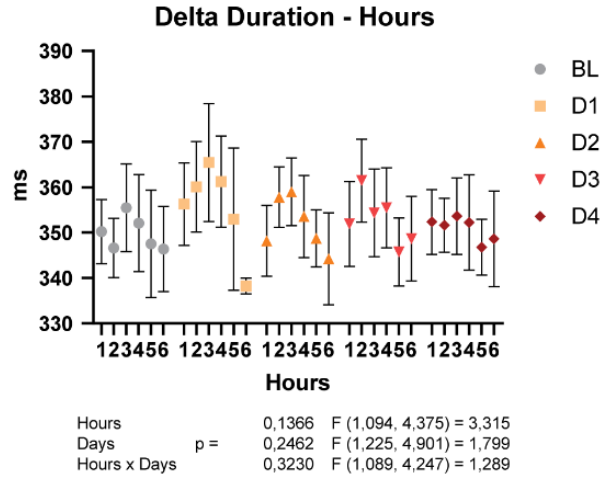
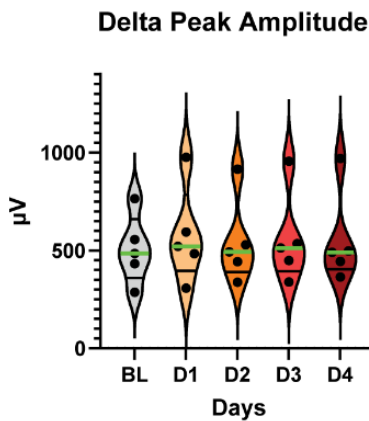
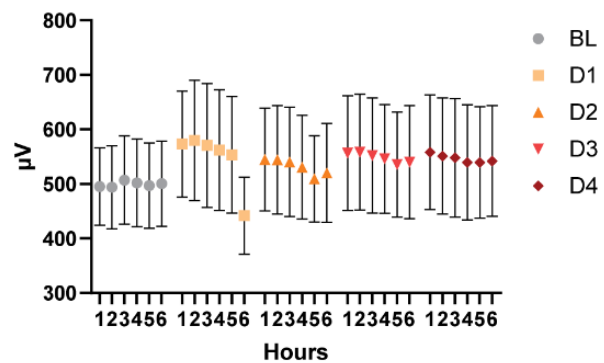
A amplitude de pico das ondas Delta também foi avaliada. Entretanto, não encontramos nenhuma variação na amplitude de pico média dos eventos ao longo dos dias [Friedman statistic  $F= 9.280$ ;  $P= 0.0545$ , Dunn's multiple comparisons test:  $p>0.05$ ] (**Figura 22F**). Além disso, não observamos mudanças estatisticamente significativas na amplitude de pico média ao longo das horas em nenhum dos dias [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.094, 4.375) = 3.315$ ;  $P=0.1366$ , post hoc Tukey test (valores de  $p$  na figura)] (**Figura 22G**).

**A**

Friedman= 10.72      p = 0.02990

**B**

Hours      p =      0,0016      F (1,807, 7,226) = 18,46  
Days      p =      0,6554      F (1,952, 7,807) = 0,4386  
Hours x Days      p =      0,1871      F (2,549, 9,942) = 1,965

**C****D****E****F****G** **Delta Peak Amplitude - Hours**

Hours      p =      0,11239      F (1,743, 6,970) = 3,069  
Days      p =      0,2438      F (1,929, 7,717) = 1,702  
Hours x Days      p =      0,5109      F (2,495, 9,732) = 0,7807

**Figura 22 - Características das ondas Delta ao longo dos dias de registro.** **A** - Ocorrência média das ondas Delta ao longo dos dias de registro. **B** - Ocorrência média das ondas Delta ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - Comparação da média da ocorrência de ondas Delta entre os dias BL e D1. **D** - Duração média das ondas Delta ao longo dos dias de registro. **E** - Duração média das ondas Delta ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **F** - Amplitude de pico média das ondas Delta ao longo dos dias de registro. **G** - Amplitude de pico média das ondas Delta ao longo das horas dos diferentes dias de registro.

#### 4.3.7. Spindle

Em circuitos neocorticais, assim como as ondas Delta, Spindles também estão associadas a processos de consolidação de memória declarativas (Gais et al. 2002; Tamminen et al. 2010; Fogel e Smith, 2011; Jegou et al. 2019, Peyrache e Seibt, 2020). Sabe-se, por exemplo, que a ocorrência destes eventos está associada à ativação de grupos de neurônios específicos do mPFC em resposta à sinalização hipocampal (Peyrache et al. 2011). Ainda, já foi observado um aumento na ocorrência e na amplitude das Spindles no mPFC no sono pós-aprendizado no BM (Binder et al. 2019). Em vista disso, avaliamos a ocorrência, amplitude e duração média das Spindles a fim de testar a hipótese de que o processo de aprendizado no BM modifica a atividade destes eventos no mPFC.

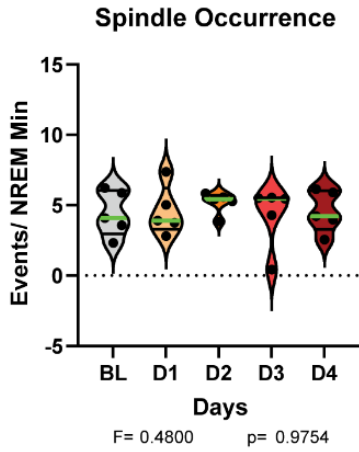
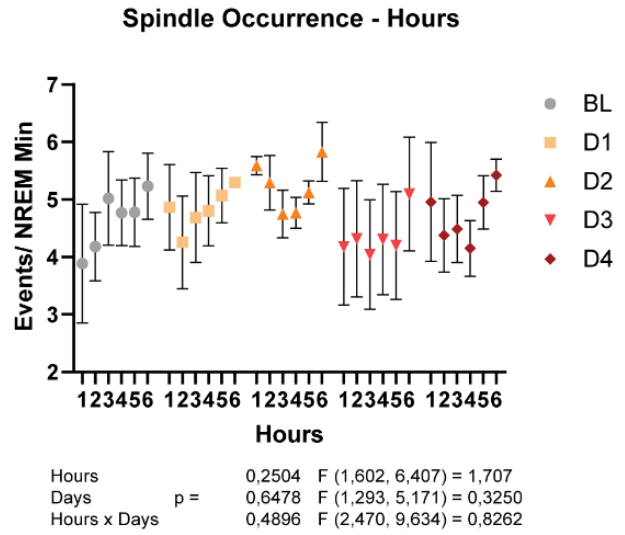
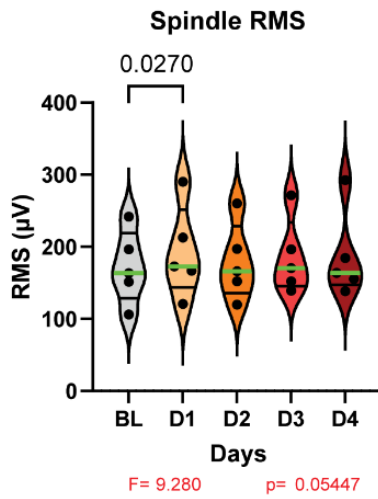
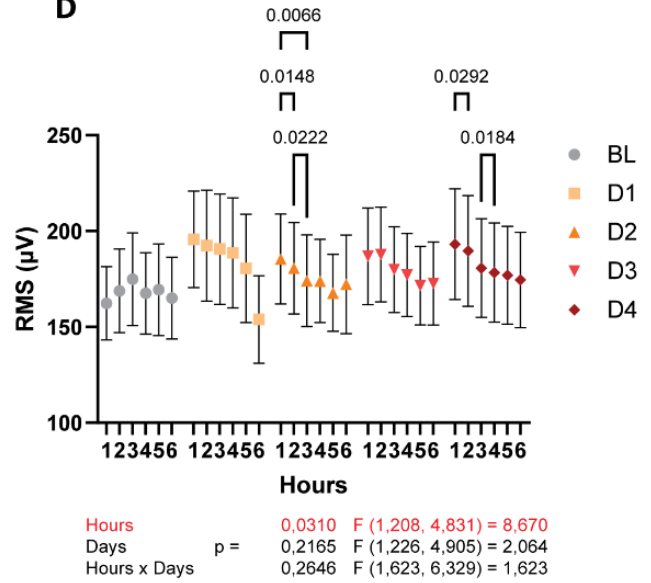
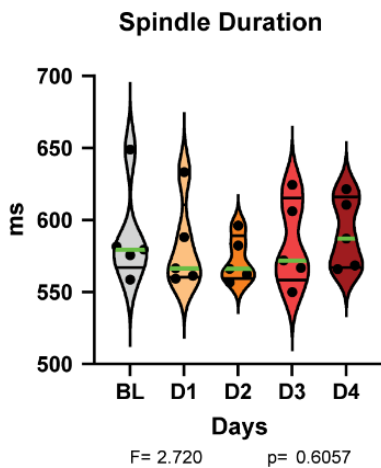
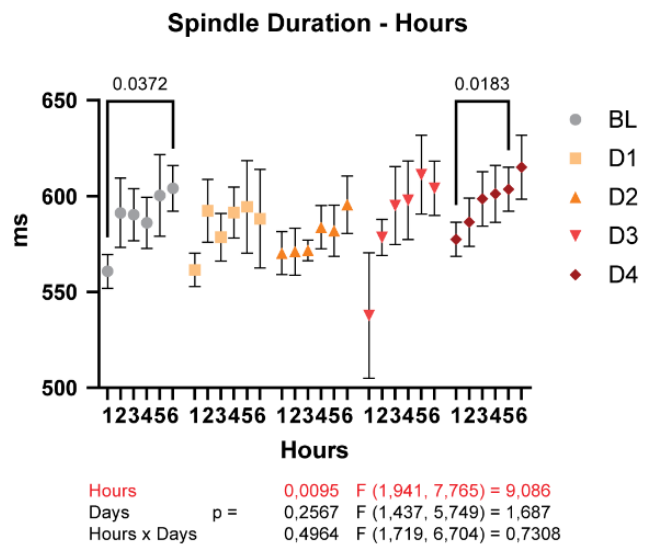
A ocorrência de Spindles no mPFC foi avaliada ao longo dos dias de aquisição no BM, considerando apenas as três primeiras horas de registro de cada dia. Não observamos mudanças estatisticamente significativas na ocorrência de Spindles em nenhum dos dias de registro [Friedman statistic  $F= 0.4800$ ;  $P=0.9754$  Dunn's multiple comparisons test:  $p>0.05$ ] (**Figura 23A**). Além disso, ao comparar a ocorrência de Spindles ao longo das horas de registro, também não há mudanças estatisticamente significativas em nenhum dos dias [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.602, 6.407) = 1.707$ ;  $P=0.2504$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 23B**).

O RMS das Spindles também foi avaliado. Observamos um aumento estatisticamente significativo do RMS médio dos eventos no dia D1 em comparação com o BL [Rank sum diff BL vs. D1:  $-15.00$ ; Friedman statistic  $F= 9.280$ ;  $p= 0.0544$ , Dunn's multiple comparisons test: BL vs. D1:  $p = 0.0270$ ] (**Figura 23C**). Contudo, encontramos uma redução do RMS das Spindles entre a hora 1 e as horas 2 e 3, e entre as horas 2 e 3 do dia D2. Além disso, essa redução do RMS também ocorre

entre as horas 1 e 2 e entre as horas 3 e 4 do dia D4. [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.208, 4.831) = 8.670$ ;  $P = 0.0310$ , post hoc Tukey test (valores de p na figura)] (**Figura 23D**).

Para concluir, analisamos a duração média das Spindles. Não observamos mudanças estatisticamente significativas na duração das Spindles em nenhum dos dias de registro [Friedman statistic  $F = 2.720$ ;  $p = 0.6057$ , Dunn's multiple comparisons test:  $p > 0.05$ ] (**Figura 23E**). Entretanto, observamos um aumento estatisticamente significativo na duração média das Spindles entre as horas 1 e 6 do dia BL e entre as horas 1 e 5 do dia D4 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(1.941, 7.765) = 9.086$ ;  $P = 0.0095$ , post hoc Tukey test (valores de p na figura)] (**Figura 23F**).



**A****B****C****D****E****F**

**Figura 23 - Características das Spindles ao longo dos dias de registro.** **A** - Ocorrência média de Spindles ao longo dos dias de registro. **B** - Ocorrência média de Spindles ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - RMS médio das Spindles ao longo dos dias de registro. **D** - RMS médio das Spindles ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **E** - Duração média das Spindles ao longo dos dias de registro. **F** - Duração média das Spindles ao longo das horas dos diferentes dias de registro.

#### 4.3.8. Acoplamento de SWRs, ondas Delta e Spindles

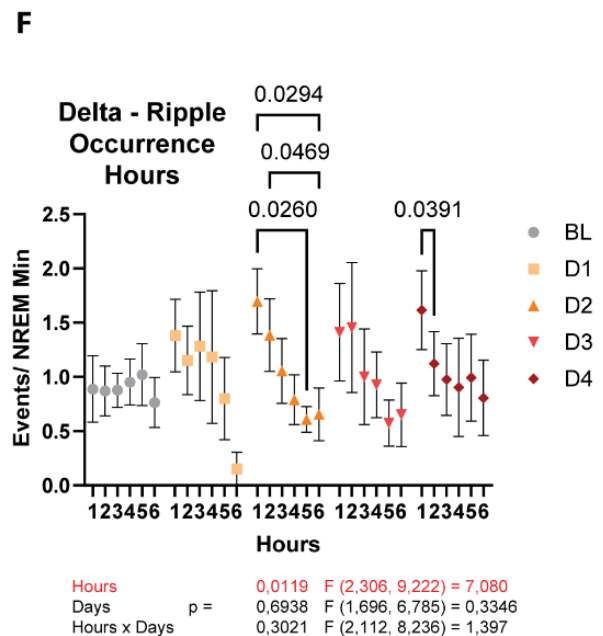
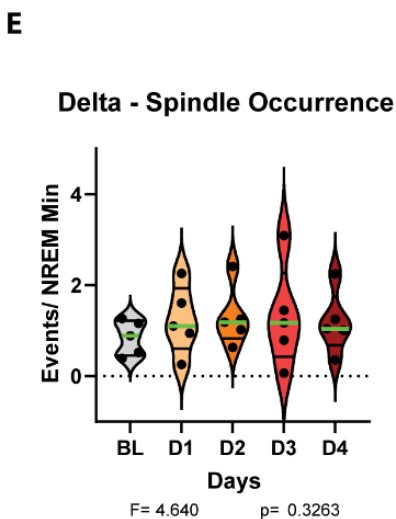
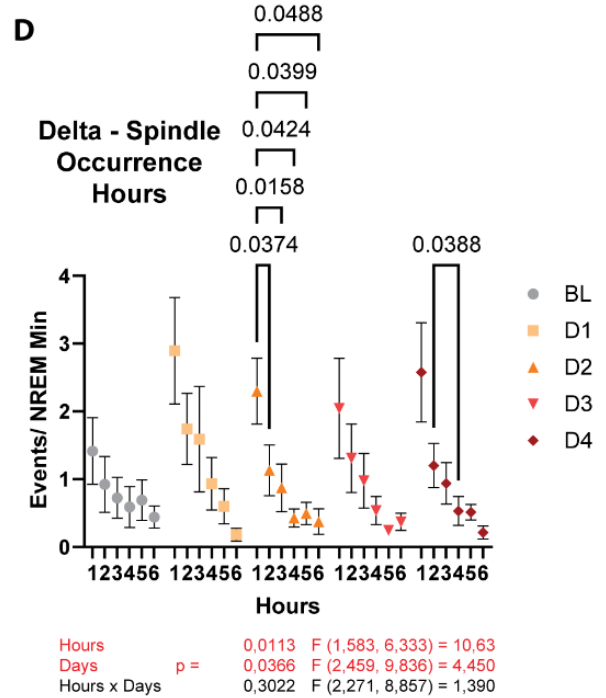
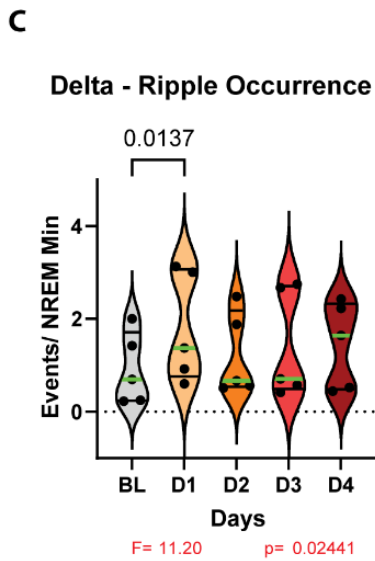
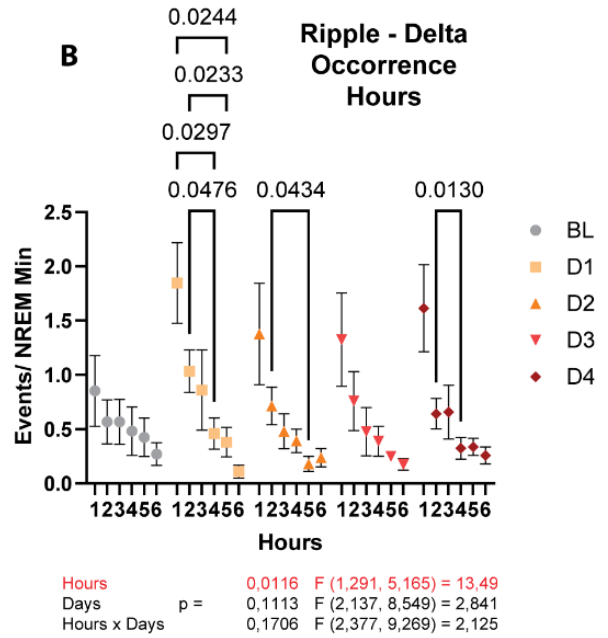
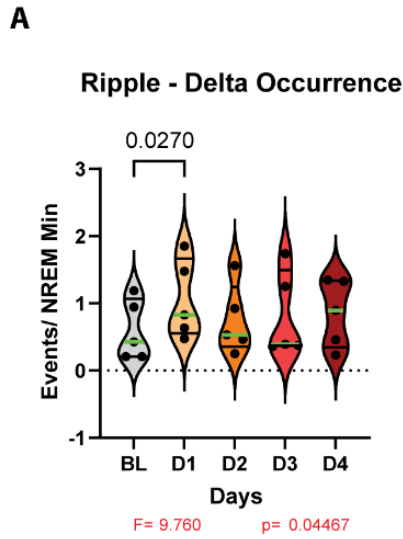
Os padrões oscilatórios e atividade neuronal neocorticais estão fortemente atrelados à atividade hipocampal durante o sono NREM (Wei et al. 2016; Maingret et al. 2016; Todorova e Zugaro, 2019). Em especial, o acoplamento temporal entre SWRs, ondas Delta e Spindles é importante para a consolidação de memórias declarativas (Maingret et al. 2016, Binder et al. 2019). Portanto, o acoplamento entre estes eventos oscilatórios relevantes a processos mnemônicos também foi avaliado ao longo dos dias de aquisição no BM.

A ocorrência de SWRs e ondas Delta acopladas (Ripple-Delta) apresentou um aumento estatisticamente significativo no D1 em relação ao BL [BL vs. D1 Rank Diff. = -15.00; Friedman statistic  $F= 9.760$ ;  $P= 0.0447$ , Dunn's multiple comparisons test: BLvsD1 0.0270] (**Figura 24A**). Além disso, ao comparar a ocorrência de Ripple-Delta ao longo das horas de registro, há uma redução do número de eventos por minuto de sono NREM em comparação à primeira hora de registro, mas também em relação à segunda hora nos dias D1, D2 e D4 [Mixed-effects model (REML); Horas: (1.291, 5.165) = 13.49;  $P=0.0116$ , post hoc Tukey test (valores de p na figura)] (**Figura 24B**).

O acoplamento entre ondas Delta e SWR (Delta-Ripple) segue um padrão similar ao acoplamento Ripple-Delta. Nesse sentido, a ocorrência de Delta-Ripple apresentou um aumento estatisticamente significativo entre o BL e o D1 [BL vs. D1 Rank Diff. = -16.00; Friedman statistic  $F= 11.20$ ;  $P= 0.0244$ , Dunn's multiple comparisons test: BLvsD1: 0.0137] (**Figura 24C**). Além disso, ao comparar a ocorrência de Delta-Ripple ao longo das horas de registro, há uma redução do número de eventos por minuto de sono NREM em comparação à primeira hora de registro no dia D2 e também há uma queda entre as horas 2 e 4 do dia D4 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F (1.583, 6.333) = 10.63$ ;  $P=0.0113$ , post hoc Tukey test (valores de p na figura)] (**Figura 24D**). O modelo de efeito misto (REML) indica a existência de

uma diferença na ocorrência de Delta-Spindle entre os dias, mas o teste post hoc não foi capaz de revelar em quais comparações tais diferenças existem [Mixed-effects model (REML); Dias:  $F(2.459, 9.836) = 4.450$ ;  $P=0.0366$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ].

O acoplamento entre ondas Delta e Spindles (Delta-Spindle) também foi avaliado. A ocorrência de Delta-Spindle não apresentou mudanças estatisticamente significativas entre os dias de registro [Friedman statistic  $F= 4.640$ ;  $P=0.3263$  Dunn's multiple comparisons test:  $p>0.05$ ] (**Figura 24E**). Contudo, ao comparar a ocorrência de Delta-Spindle ao longo das horas de registro, há uma redução do número de eventos por minuto de sono NREM em comparação à primeira hora de registro, mas também em relação à segunda hora no dia D2. Além disso, também há uma queda entre as horas 1 e 2 do dia D4 [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(2.306, 9.222) = 7.080$ ;  $P=0.0119$ , post hoc Tukey test (valores de p na figura)] (**Figura 24F**).



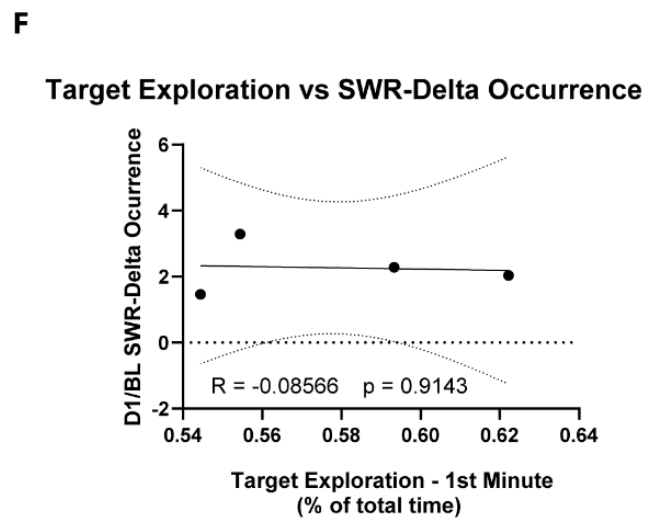
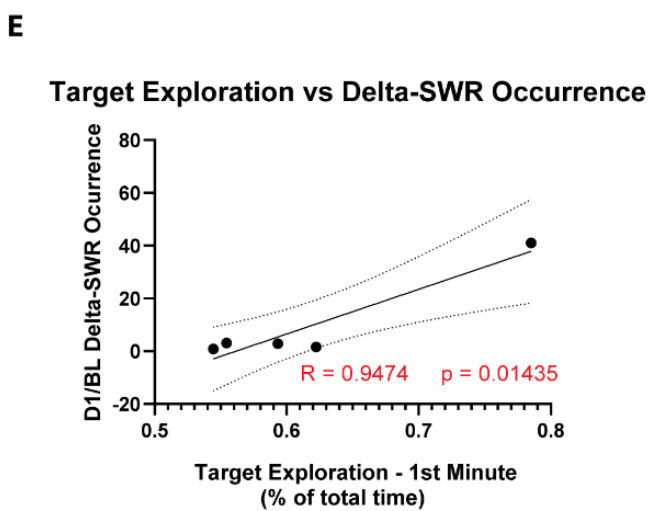
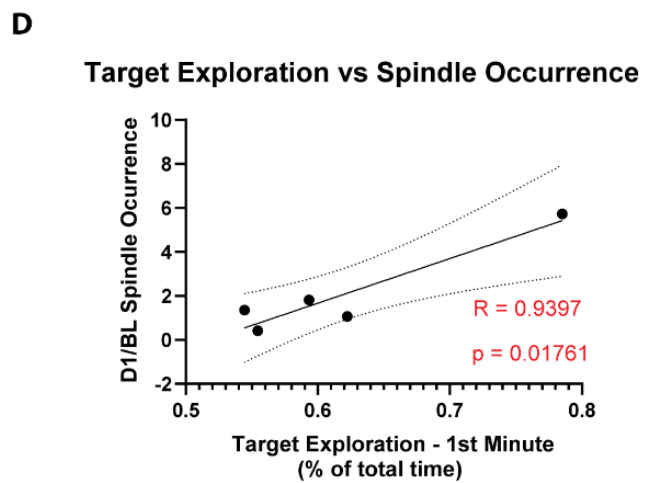
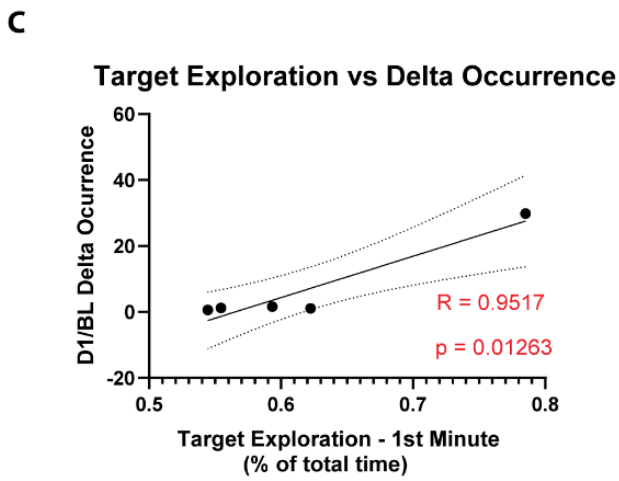
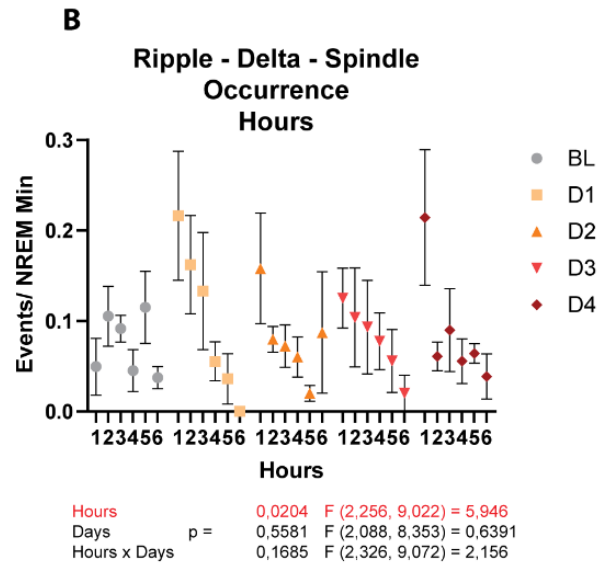
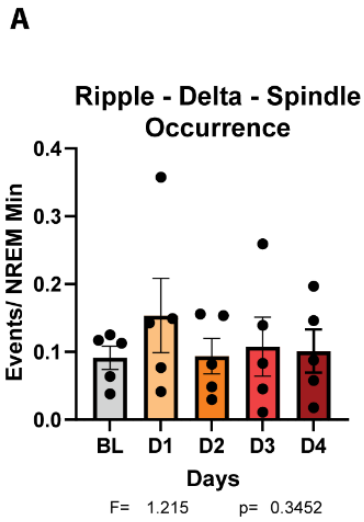
**Figura 24 - Ocorrência do acoplamento temporal das SWRs, Delta e Spindles ao longo dos dias de registro.** **A** - Ocorrência média de SWRs-Delta acopladas ao longo dos dias de registro. **B** - Ocorrência média de SWRs-Delta acopladas ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - Ocorrência média de Delta-SWRs acopladas ao longo dos dias de registro. **D** - Ocorrência média de Delta-SWRs acopladas ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **E** - Ocorrência média de Delta-Spindle acopladas ao longo dos dias de registro. **F** - Ocorrência média de Delta-Spindle acopladas ao longo das horas dos diferentes dias de registro.

Contabilizamos também o acoplamento entre os três eventos (Ripple-Delta-Spindle). A ocorrência conjunta destes eventos não apresentou mudanças estatisticamente significativas entre os dias de registro [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.839, 7.356) = 1.215$ ;  $P=0.3452$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 25A**). Porém, ao comparar a ocorrência de Ripple-Delta-Spindles ao longo das horas de registro, o modelo de efeito misto indica que há uma mudança no número de eventos por minuto de sono NREM ao longo das horas de registro. Entretanto, o teste post hoc não foi capaz de determinar onde tais diferenças se encontram [Mixed-effects model (REML); Dias:  $F(2.256, 9.022) = 5.946$ ;  $P=0.0204$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 25B**).

Para testar a relevância das ondas Delta e Spindles e do acoplamento temporal das SWRs, ondas Delta e Spindles como marcadores eletrofisiológicos da consolidação da memória no BM, extraímos 4 razões. A saber, 1 - a razão da ocorrência de ondas Delta em NREM na primeira hora do D1 pela ocorrência de ondas Delta em NREM na primeira hora do BL; 2 - a razão da ocorrência de Spindles em NREM na primeira hora do D1 pela ocorrência de Spindles em NREM na primeira hora do BL; 3 - a razão da ocorrência de Delta-SWRs na primeira hora do D1 pela primeira hora do BL; 4 - a razão da ocorrência de SWRs-Delta na primeira hora do D1 pela primeira hora do BL. Posteriormente, utilizando a correlação de Pearson, extraímos a relação linear entre as razões em questão e o tempo total de exploração da região alvo no primeiro minuto no dia de teste no BM, o principal índice de desempenho dos animais na tarefa.

O cálculo da correlação de Pearson indicou uma forte correlação positiva entre a razão de ocorrência de ondas Delta entre o D1 e o BL (1) e o desempenho dos animais no BM ( $R = 0.9517$ ,  $p = 0.01263$ ) (**Figura 25C**). Houve também uma forte correlação positiva entre a razão de ocorrência de Spindles entre o D1 e o BL (2) e o desempenho dos animais no BM ( $R = 0.9397$ ,  $p = 0.01761$ ). (**Figura 25D**). Em relação

ao acoplamento de eventos, há uma forte correlação positiva entre a razão de ocorrência de Delta-SWR entre o D1 e o BL (3) e o desempenho dos animais teste no BM ( $R = 0.9474$   $p = 0.01435$ ). (**Figura 25E**). Em contrapartida, não há uma tendência de correlação para a razão da ocorrência de SWR-Delta entre o D1 e o BL ( $R = -0.08566$ ,  $p = 0.9143$ ) (**Figura 25F**).



**Figura 25 - Ocorrência de SWRs-Delta-Spindle acopladas ao longo dos dias de registro e correlação entre as ondas Delta, Spindle e o acoplamento destes eventos e a eficácia de consolidação da memória. A** - Ocorrência média de SWRs-Delta-Spindle acopladas ao longo dos dias de registro. **B** - Ocorrência média de SWRs-Delta-Spindle acopladas ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - Correlação de Pearson entre a exploração do quadrante alvo no primeiro minuto da sessão de teste e a razão entre a ocorrência de ondas Delta na primeira hora do dia D1 pela primeira hora do dia BL. **D** - Correlação de Pearson entre a exploração do quadrante alvo no primeiro minuto da sessão de teste e a razão entre a ocorrência de Spindles na primeira hora do dia D1 pela primeira hora do dia BL. **E** - Correlação de Pearson entre a exploração do quadrante alvo no primeiro minuto da sessão de teste e a razão entre a ocorrência de Delta-SWRs acopladas na primeira hora do dia D1 pela primeira hora do dia BL. **F** - Correlação de Pearson entre a exploração do quadrante alvo no primeiro minuto da sessão de teste e a razão entre a ocorrência de SWRs-Delta acopladas na primeira hora do dia D1 pela primeira hora do dia BL.

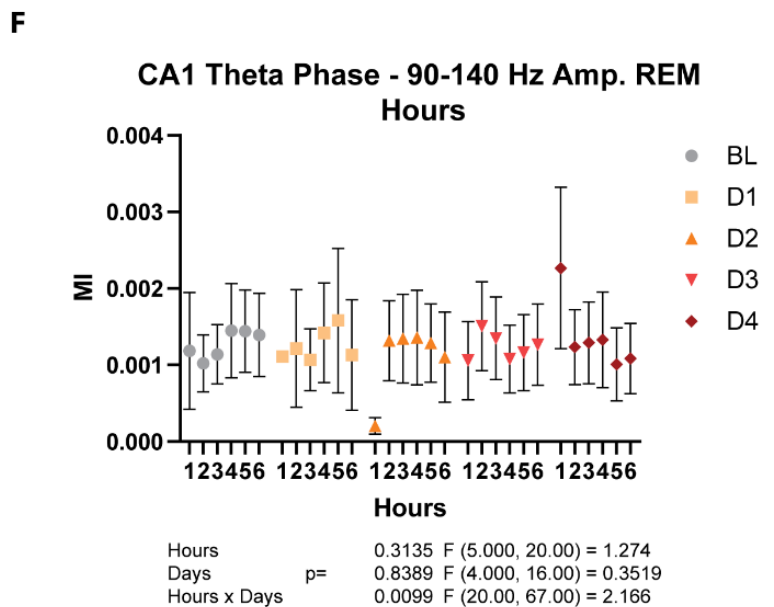
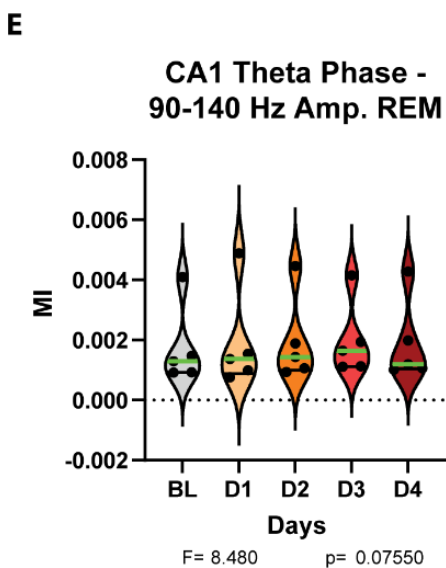
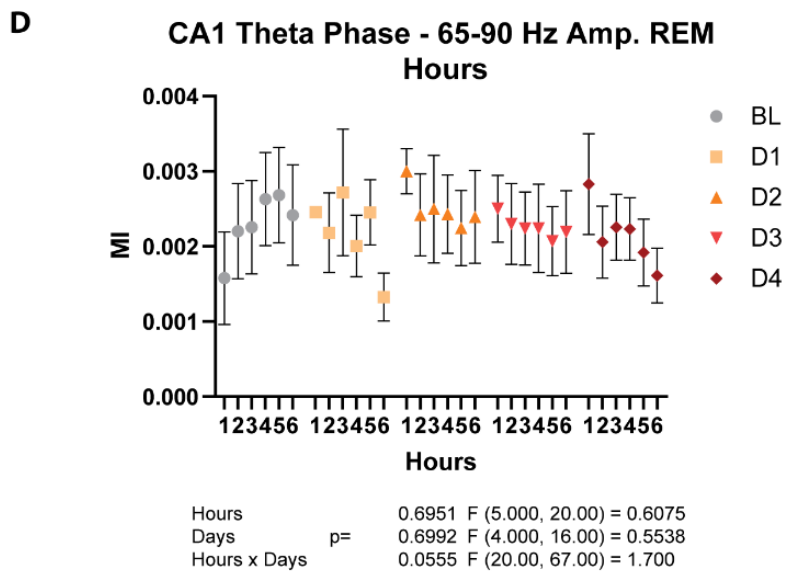
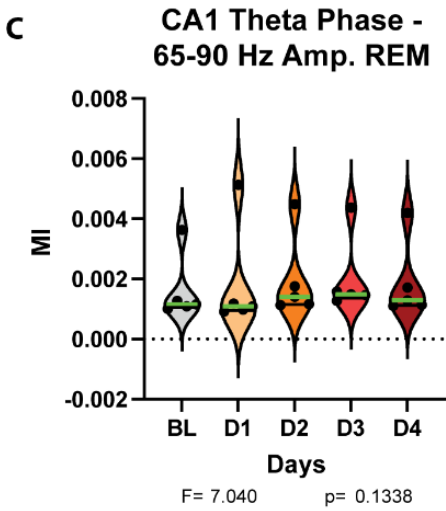
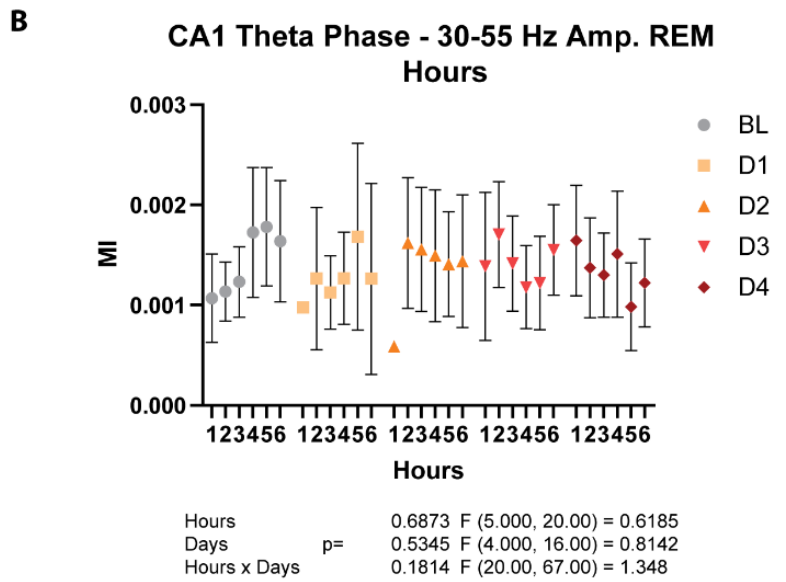
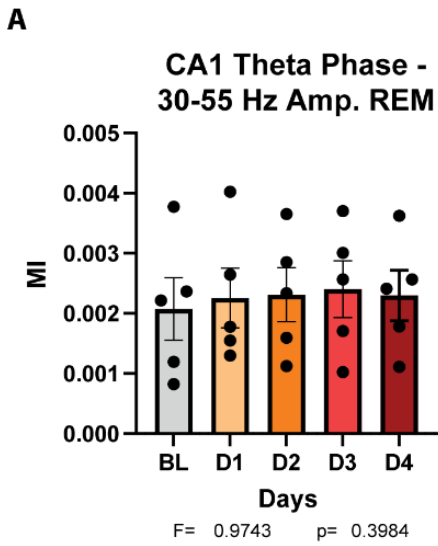
#### **4.3.9. Acoplamento de frequência cruzada**

A interação entre ritmos distintos no cérebro está associada a funções executivas e em especial, a processos mnemônicos e coordenação da atividade neural entre áreas (Canolty e Knight, 2010; Canolty et al. 2012). Uma das formas de interação se dá pela modulação da amplitude de um sinal pela fase de outro, o acoplamento de frequência cruzada (CFC) fase-amplitude (Canolty et al. 2012). Nesse caso, um exemplo deste processo é o acoplamento que existe entre a fase de Teta e a amplitude de Gama no hipocampo. Já foi observado, por exemplo, que o CFC Teta-Gama é importante para o processo de evocação de memórias espaciais (Tort et al. 2009) e para a reconsolidação da memória de esQUIVA aprendida (Radiske et al. 2020). Além disso, o acoplamento Teta-Gama também já foi observado durante o sono REM (Scheffzük et al. 2011). Portanto, para testar a relevância da interação das oscilações Teta-Gama no processo de consolidação de memórias do BM durante o sono REM realizamos a análise do CFC fase-amplitude Teta-Gama ao longo dos dias de registro.

Inicialmente, avaliamos a intensidade da modulação da fase das oscilações Teta sobre a amplitude das oscilações Gama baixa (30-55 Hz), Gama alta (65-90 Hz) e oscilações de alta frequência (HFO: 90-140 Hz) durante o sono REM das 3 últimas horas de registro de cada dia. Não observamos mudanças estatisticamente significativas no índice de modulação da amplitude da faixa de Gama baixa pela fase



de Teta ao longo dos dias de registro [RM One-way-ANOVA; Dias:  $F(1.378, 5.511) = 0.9743$ ;  $P=0.3984$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 26A**). Além disso, também não houve mudanças estatisticamente significativas no índice de modulação ao longo das horas de registro em nenhum dos dias [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(5.000, 20.00) = 0.6185$ ;  $P=0.6873$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 26B**). De forma semelhante, não houve alterações no índice de modulação da amplitude da faixa de Gama alta pela fase de Teta ao longo dos dias [Friedman statistic  $F= 7.040$ ;  $P= 0.1338$ , Dunn's multiple comparisons test  $p>0.05$ ] (**Figura 26C**) e nem ao longo das horas de registro [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(5.000, 20.00) = 0.6075$ ;  $P=0.6951$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 26D**). Por fim, não observamos alterações estatisticamente significativas no índice de modulação da amplitude da faixa de HFO pela fase de Teta ao longo dos dias [Friedman statistic  $F= 8.480$ ;  $P= 0.0755$ , Dunn's multiple comparisons test  $p>0.05$ ] (**Figura 26E**). Também não observamos mudanças estatisticamente significativas no índice de modulação HFO-Teta ao longo das horas de registro [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(5.000, 20.00) = 1.274$ ;  $P=0.3135$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 26F**).

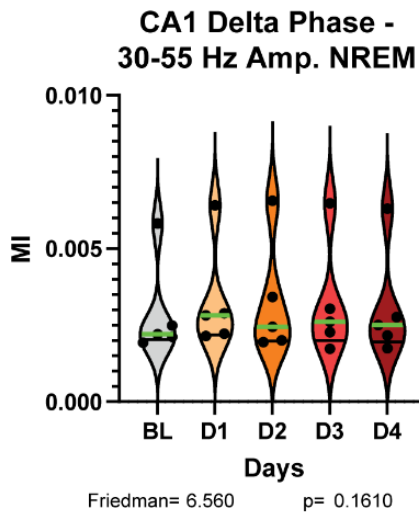
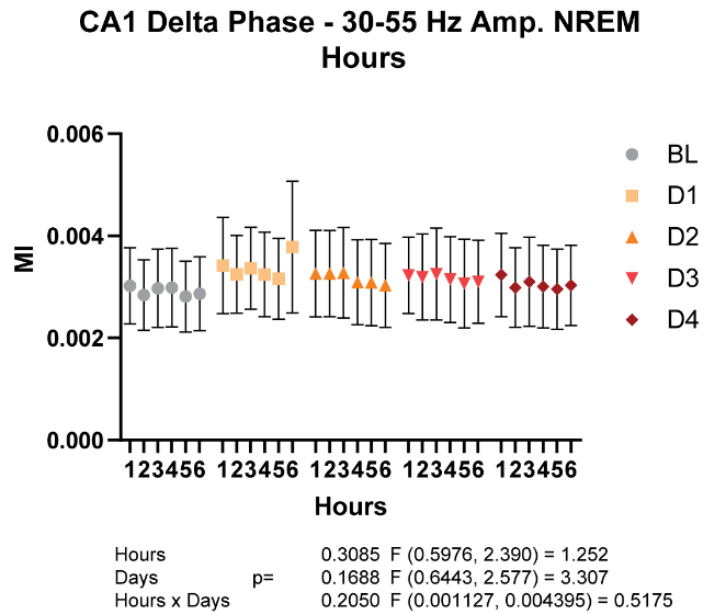
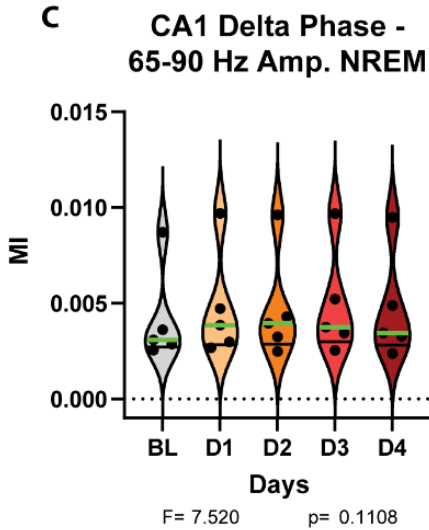
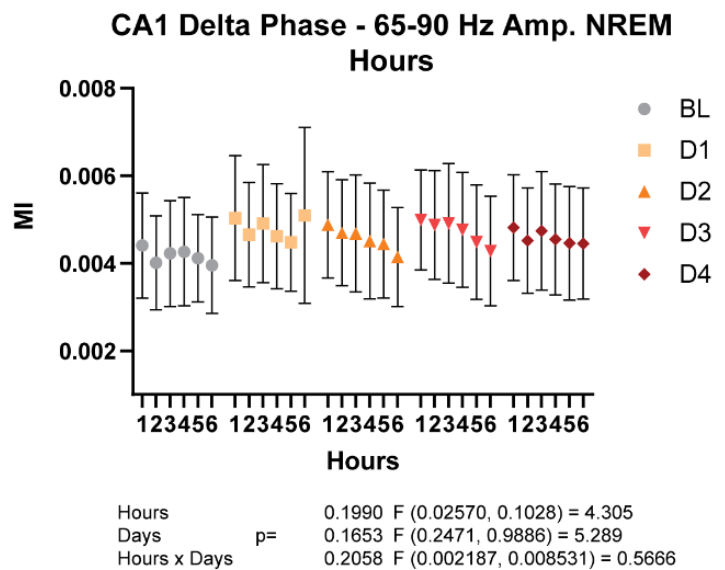
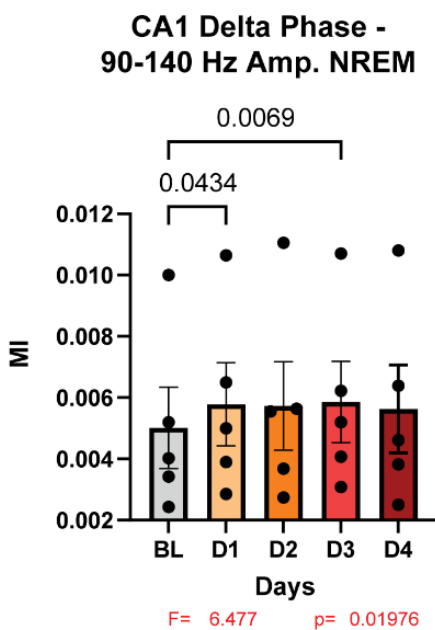
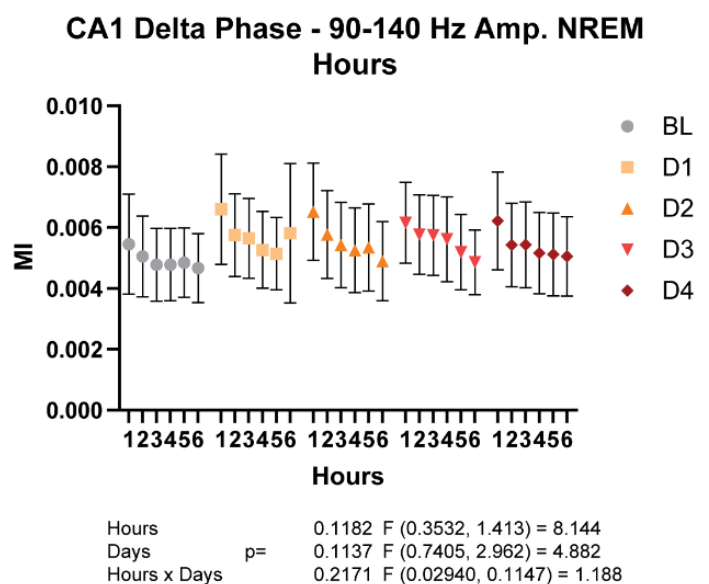


**Figura 26 - Acoplamento de frequência cruzada da amplitude de Gama baixa, alta e HFO pela fase de Teta em CA1 durante o registro de linha de base. A** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 30-55 Hz pela banda Teta durante o sono REM ao longo dos dias de registro. **B** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 30-55 Hz pela banda Teta durante o sono REM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 65-90 Hz pela banda Teta durante o sono REM ao longo dos dias de registro. **D** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 65-90 Hz pela banda Teta durante o sono REM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **E** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 90-140 Hz pela banda Teta durante o sono REM ao longo dos dias de registro. **F** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 90-140 Hz pela banda Teta durante o sono REM ao longo das horas dos diferentes dias de registro.

As interações entre o ritmos Teta e Gama são mais comumente estudadas, contudo, interações entre as ondas Delta e oscilações de maior frequência também estão presentes no cérebro de mamíferos (Canolty e Knight, 2010). Sabe-se, por exemplo, que o aumento da sinalização dopaminérgica no mPFC aumenta o acoplamento fase-amplitude entre ondas Delta e Gama em animais em livre movimento (Andino-Pavlovsky et al. 2017). Entretanto, não existem evidências suficientes que indiquem a relevância do CFC fase-amplitude Delta-Gama ou Delta-HFO em processos mnemônicos.

Portanto, para testar o papel da interações entre estes ritmos no hipocampo durante o processo de consolidação de memórias no sono NREM, avaliamos a intensidade da modulação da fase das oscilações Delta sobre a amplitude das oscilações Gama baixa (30-55 Hz), Gama alta (65-90 Hz) e oscilações de alta frequência (HFO: 90-140 Hz) durante o sono NREM nas 3 primeiras horas de registro de cada dia. Não observamos mudanças estatisticamente significativas no índice de modulação da amplitude da faixa de Gama baixa pela fase de Delta ao longo dos dias de registro [Friedman statistic  $F = 6.560$ ;  $P = 0.1610$  Dunn's multiple comparisons test:  $p > 0.05$ ] (**Figura 27A**). Além disso, também não houve mudanças estatisticamente significativas no índice de modulação ao longo das horas de registro em nenhum dos dias [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(0.5976, 2.390) = 1.252$ ;  $P = 0.3085$ , post hoc Tukey test  $p > 0.05$ ] (**Figura 27B**). De forma semelhante, não houve alterações no índice de modulação da amplitude da faixa de Gama alta pela fase de Delta ao longo dos dias [Friedman statistic  $F = 7.520$ ;  $P = 0.1108$  Dunn's multiple comparisons test:  $p > 0.05$ ] (**Figura 27C**) e nem ao longo das horas de registro [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(0.02570, 0.1028) = 4.305$ ;  $P = 0.1990$ , post hoc Tukey test  $p > 0.05$ ]

(**Figura 27D**). Entretanto, observamos um aumento do índice de modulação da amplitude de HFO pela fase de Delta entre os dias BL e D1, e BL e D3 [Mean diff: BLvsD1: -0.0007672; BLvsD3: -0.0008421 One-way-ANOVA;  $F(2.068, 8.274) = 6.477$ ;  $P=0.0198$ , post hoc Tukey test: BLvsD1:  $p=0.0434$ ; BLvsD3: $p=0.0069$ ] (**Figura 27E**). Por fim, não houve mudanças estatisticamente significativas no índice de modulação HFO-Delta ao longo das horas de registro [Mixed-effects model (REML); Horas:  $F(0.3532, 1.413) = 8.144$ ;  $P=0.1182$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura 27F**).

**A****B****C****D****E****F**

**Figura 27 - Acoplamento de frequência cruzada da amplitude de Gama baixa, alta e HFO pela fase de Delta no sono NREM em CA1 durante o registro de linha de base. A** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 30-55 Hz pela banda Delta durante o sono NREM ao longo dos dias de registro. **B** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 30-55 Hz pela banda Delta durante o sono NREM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **C** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 65-90 Hz pela banda Delta durante o sono NREM ao longo dos dias de registro. **D** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 65-90 Hz pela banda Delta durante o sono NREM ao longo das horas dos diferentes dias de registro. **E** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 90-140 Hz pela banda Delta durante o sono NREM ao longo dos dias de registro. **F** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 90-140 Hz pela banda Delta durante o sono NREM ao longo das horas dos diferentes dias de registro.

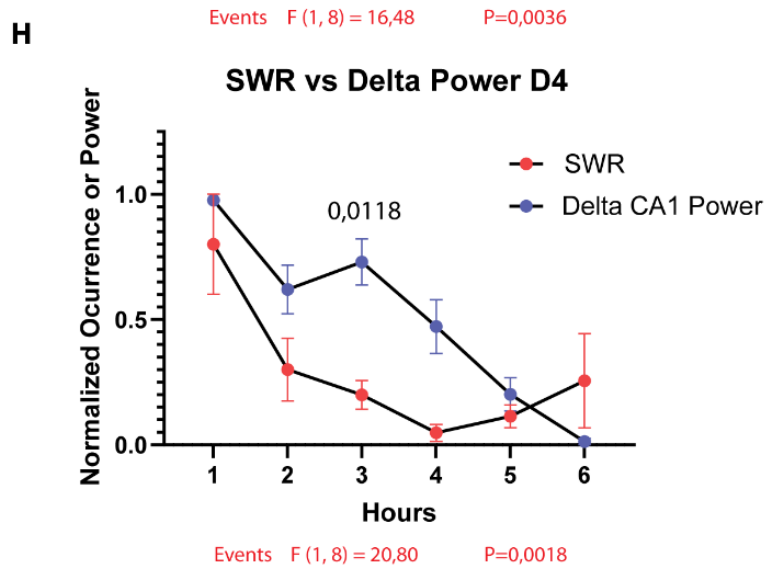
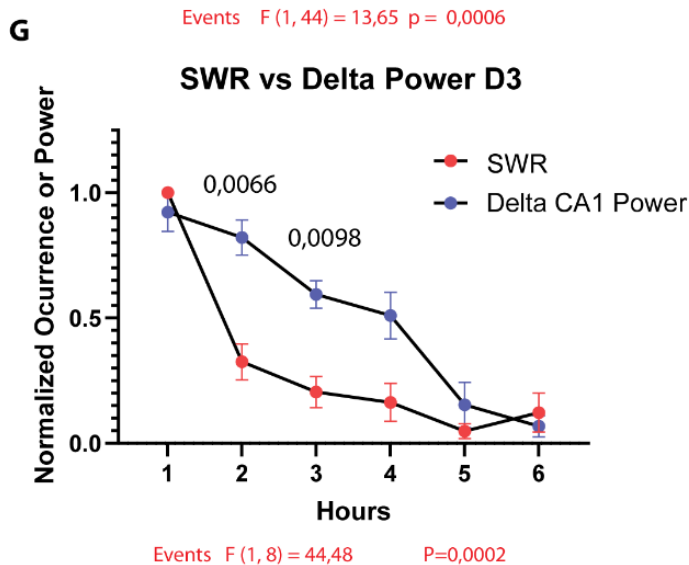
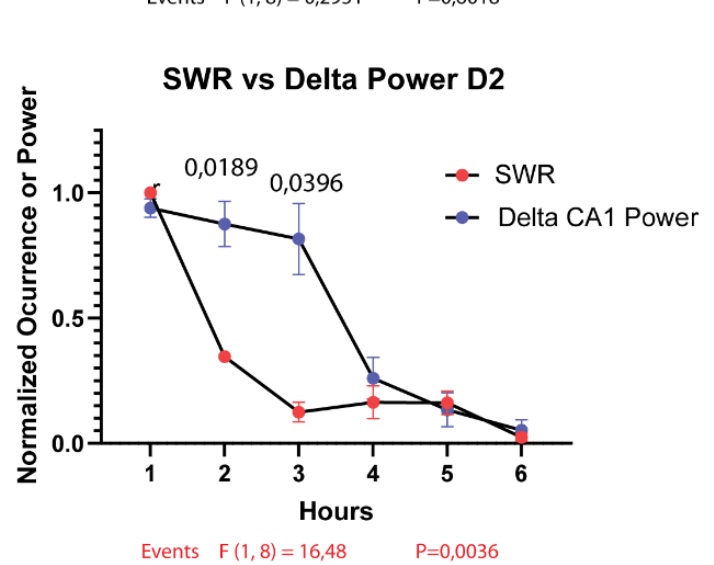
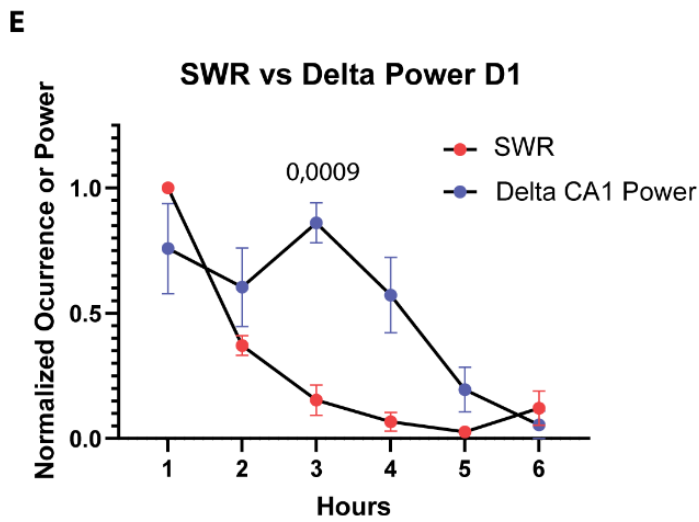
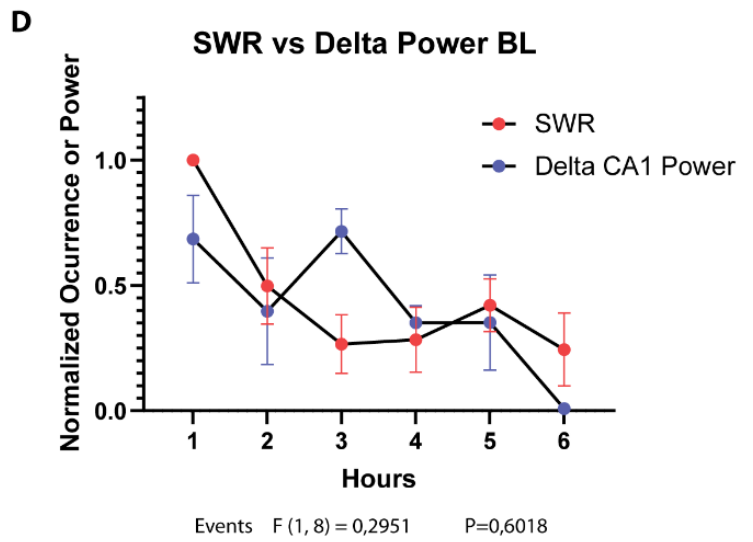
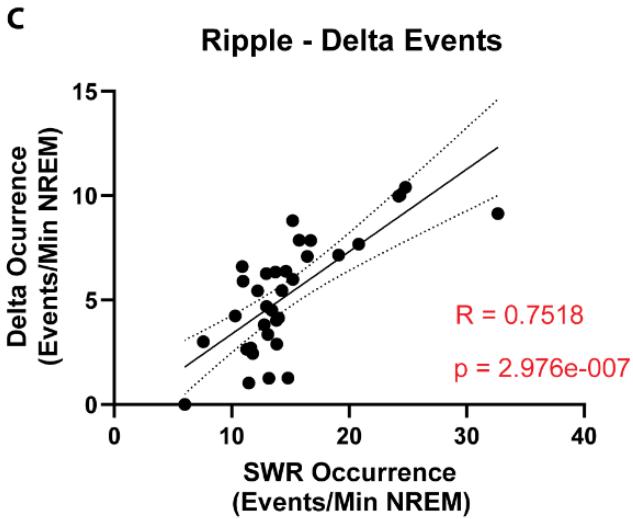
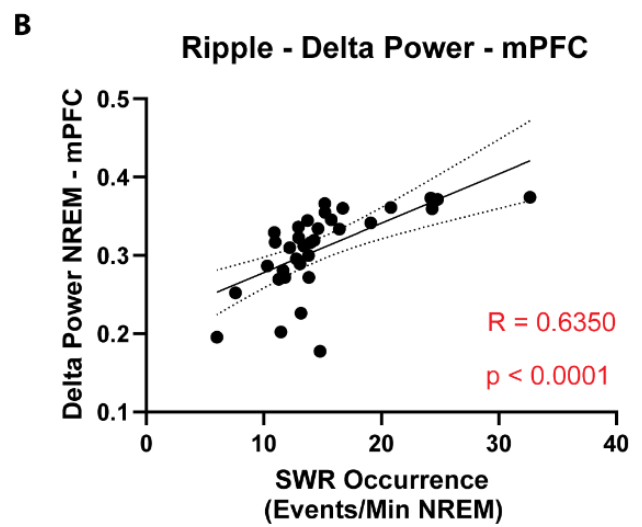
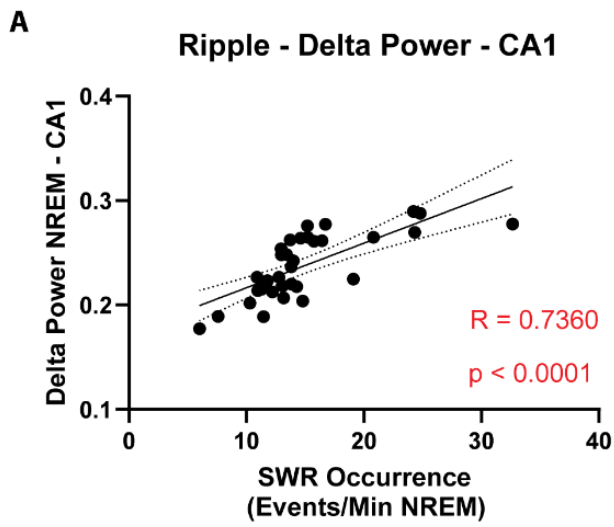
#### 4.3.10. Relação entre SWRs e a atividade de ondas lentas

Neste trabalho, observamos que a ocorrência de SWRs e a potência de Delta em CA1 e no mPFC apresentam um padrão de queda ao longo das horas de registro. A partir desta observação, formulamos a hipótese de que o padrão de queda da potência de Delta em CA1 é semelhante ao padrão de queda da ocorrência de SWRs ao longo dos dias e horas de registro. Para testar tal hipótese, correlacionamos os valores médios de potência de Delta (no mPFC e em CA1) e ocorrência de SWRs de cada uma das horas de registro de todos os dias.

A correlação de Pearson indicou uma forte correlação positiva entre a ocorrência de SWRs e a potência da faixa de Delta em CA1 ao longo das horas e dias ( $R = 0.7360$ ,  $p < 0.0001$ ) (**Figura 28A**). De forma parecida, há uma forte correlação positiva entre a ocorrência de SWRs e a potência da faixa de Delta no mPFC ( $R = 0.6350$ ,  $p < 0.0001$ ) (**Figura 28B**). Ainda, a ocorrência de SWRs e de ondas Delta no mPFC também apresenta uma alta correlação positiva ( $R = 0.7518$ ,  $p = 2.976e-007$ ) (**Figura 28C**).

Além disso, comparamos também o padrão de queda da ocorrência de SWRs e da potência da faixa de Delta em CA1 ao longo das horas nos diferentes dias de registro. Esta comparação foi importante para entender o efeito do aprendizado no BM sobre a similaridade da variação dos parâmetros em questão ao longo das horas de registro. Nesse caso, para o registro BL, não há uma diferença estatisticamente significativa entre os dois padrões [RM Two-way-ANOVA; Eventos:  $F(1, 8) = 0,2951$

$P=0,6018$ ; post hoc Šídák's multiple comparisons test  $p>0.05$ ]. Entretanto, os padrões de queda das SWRs e da potência de Delta em CA1 são diferentes nos outros dias de registro: D1 [3:  $-0,7072$ ; RM Two-way-ANOVA; Eventos:  $F(1, 44) = 13,65$   $p = 0,0006$ ; post hoc Šídák's multiple comparisons test, 3:  $p=0,0009$ ]; D2 [2:  $-0,5290$ ; 3:  $-0,6910$ ; RM Two-way-ANOVA; Eventos:  $F(1, 8) = 16,48$   $P=0,0036$ ; post hoc Šídák's multiple comparisons test, 2:  $p=0,0189$ ; 3:  $p=0,0396$ ]; D3 [2:  $-0,4961$ ; 3:  $-0,3892$ ; RM Two-way-ANOVA; Eventos:  $F(1, 8) = 44,48$   $P=0,0002$ ; post hoc Šídák's multiple comparisons test, 2:  $p=0,0066$ ; 3:  $p=0,0098$ ]; D4 [2:  $-0,5306$ ; RM Two-way-ANOVA; Eventos:  $F(1, 8) = 20,80$   $P=0,0018$ ; post hoc Šídák's multiple comparisons test, 3:  $p=0,0118$ ] (**Figura 28D-E**)





**Figura 28 - Correlação entre a ocorrência de SWRs e a potência da banda Delta no mPFC e CA1 e a relação temporal entre a queda destes parâmetros nos diferentes dias de registro. A -** Correlação de Pearson entre a ocorrência média de SWRs e a potência média da banda Delta em CA1 nas diferentes horas e dias de registro. **B -** Correlação de Pearson entre a ocorrência média de SWRs e a potência média da banda Delta no mPFC nas diferentes horas e dias de registro. **C -** Correlação de Pearson entre a ocorrência média de SWRs e a ocorrência de ondas Delta nas diferentes horas e dias de registro. **D -** Comparação entre a variação na ocorrência de SWRs e a potência de Delta ao longo das horas do BL. **E -** Comparação entre a variação na ocorrência de SWRs e a potência de Delta ao longo das horas do D1. **F -** Comparação entre a variação na ocorrência de SWRs e a potência de Delta ao longo das horas do D2. **G -** Comparação entre a variação na ocorrência de SWRs e a potência de Delta ao longo das horas do D3. **H -** Comparação entre a variação na ocorrência de SWRs e a potência de Delta ao longo das horas do D4.

## 5. Discussão

Está estabelecido na literatura científica que padrões de atividade elétrica oscilatória do hipocampo e regiões neocorticais estão relacionados a processos de formação de memórias (Diekelmann e Born 2010; Buzsáki 2015; Klinzing et al. 2019; Almeida-Filho et al. 2018; Girardeau e Lopes-dos-Santos, 2021). Em especial, o período de sono tem um papel indispensável para a consolidação de memórias mediante processos ativos de fortalecimento de representações neurais (Ribeiro et al. 1999, 2002; Girardeau et al. 2009; Girardeau et al. 2014; Maingret et al. 2016), mas também no ajuste homeostático imprescindível à eficiente comunicação das redes neurais (Tononi e Cirelli, 2003, 2006 e 2014). Nesse sentido, a comunicação entre o hipocampo e o neocórtex é importante tanto para a aquisição de novas informações durante a vigília, mas também para a consolidação de memórias durante o sono (Buzsáki 1989; Rasch e Born, 2013; Almeida-Filho et al. 2018; Girardeau e Lopes-dos-Santos, 2021). Em especial, a comunicação entre essas áreas durante o sono parece ser essencial para a consolidação de memórias declarativas (Maingret et al. 2016; Wang e Ikemoto, 2016; Schmidt e Redish, 2021). Contudo, tais mecanismos ainda não foram completamente elucidados.

### 5.0. Os animais aprendem a tarefa e consolidam a memória eficientemente

Inicialmente, mostramos que os animais consolidam gradualmente a memória de localização do escape ao longo das sessões e dias de aquisição da tarefa. Além disso, evidenciamos através da sessão de teste que os animais de fato consolidaram a memória eficientemente.

Existem inúmeros protocolos para a execução do BM, e portanto, diversos padrões de resultados comportamentais possíveis para esta única tarefa. Carol Barnes, pesquisadora que desenvolveu o protocolo em questão, utilizou duas sessões de treino por dia durante 6 dias (Barnes et al. 1979). Como consequência, a queda na latência de escape e no número de erros aparenta ser mais gradual do que o que foi observado em nosso trabalho. Contudo, Binder et al. (2019) utilizaram um protocolo similar ao que utilizamos, e, portanto, nossos resultados comportamentais foram bastante similares. Reproduzir estes resultados é importante, uma vez que esse é o único trabalho que apresenta registros de potenciais de campo de CA1 e mPFC durante o sono de animais após sessões de treinamento no BM. Portanto, temos uma maior segurança em comparar nossos achados e adicionar novas informações à literatura, considerando que fomos capazes de reproduzir o método em questão.

### **5.1. A arquitetura do sono é alterada em resposta ao aprendizado**

O tempo despendido em cada estado do ciclo sono-vigília não sofreu alterações entre os dias de registro. Contudo, logo no primeiro dia de aquisição observa-se um aumento brusco do tempo despendido em sono NREM e REM a partir da segunda hora de registro. Esse fenômeno não é observado no BL, o que pode indicar uma maior pressão do sono nos dias de aquisição no BM (Tononi e Cirelli, 2003, 2006 e 2014). Nesse contexto, existem evidências que indicam um aumento no tempo despendido em sono NREM e REM após o aprendizado de tarefas que exigem a consolidação de memórias procedurais e declarativas (Smith et al. 2004; Hellman e Abel, 2007; Fogel et al. 2007). Em especial, as mudanças na arquitetura do sono são altamente dependentes do tipo de tarefa executada (Fogel et al. 2007), o que pode explicar as mudanças pontuais que observamos após a aquisição no BM. Entretanto, em relação à tarefa do BM, nossos resultados parecem não corroborar os dados existentes na literatura, uma vez que Binder et al. (2019) registraram o sono de camundongos após a aquisição da tarefa no BM e observaram um aumento no tempo despendido em sono REM nos dias de aquisição no BM em comparação com a BL.

O número de bouts do estado WK é maior no D1 em comparação com o BL, e os dias de aquisição no BM não apresentam uma queda brusca no número de bouts do estado WK a partir da segunda hora de registro como observado no BL. Em conjunto, estes resultados mostram uma maior fragmentação do sono dos animais no primeiro dia de aquisição no BM. Entretanto, nossos resultados mostram que o desempenho dos animais não foi prejudicada por este fenômeno. Nesse caso, existem mecanismos importantes à consolidação de memórias durante o estado acordado. Como exemplo, as SWRs que ocorrem durante períodos de imobilidade no estado acordado são importantes à formação de memórias declarativas (Karlsson et al. 2009; Tang et al. 2017). Em especial, Tang et al. (2017) mostraram que a sincronia da atividade de CA1 e do córtex pré-frontal (PFC) foi mais forte durante SWRs durante o estado acordado em períodos de imobilidade do que durante o sono NREM. Ademais, a reativação de pares de células CA1-PFC representando regiões espaciais foi mais síncrona e estruturada durante SWRs no estado acordado do que durante o sono NREM.

## **5.2. A atividade de ondas lentas é um possível marcador do processo de consolidação de memórias durante o sono NREM**

Um dos nossos principais achados é o aumento da potência em Delta em CA1 a partir do primeiro dia de aquisição no BM, e a queda gradual da atividade de ondas lentas no mPFC e CA1, significativa nos dias D1-D4. Esses resultados vão de encontro com a hipótese da homeostase sináptica durante o sono (SHY) proposta por Tononi e Cirelli (Tononi e Cirelli, 2003, 2006 e 2014). Ela defende que o estado acordado promove potenciação sináptica nas redes corticais (Vyazovskiy et al. 2008; Liu et al. 2010) e a regulação homeostática da atividade de ondas lentas durante o sono está ligada à quantidade de potenciação sináptica que se deu durante o estado acordado (Vyazovskiy et al. 2008; Huber et al. 2014). Além disso, a atividade de ondas lentas durante o sono está ligada à renormalização sináptica (Siddoway, et al. 2014; González-Rueda, et al. 2018) e em especial, a renormalização dos pesos sinápticos durante o sono de ondas lentas é essencial ao aprendizado (Markram e Tsodyks, 1996; Olcese et al. 2010; Hashmi et al. 2013; Cirelli e Tononi, 2021). O processo de aprendizado gera potenciação sináptica nas redes neocorticais e hipocampais (Roman et al. 1987; Brown et al. 1988; Bliss e Collingridge, 1993; Rioult-Pedotti et al.

2000; Whitlock et al. 2006), e conseqüentemente há um aumento da atividade de ondas lentas. Nesse caso, camundongos que passaram por uma única sessão de condicionamento por estímulo apresentaram maior potência de Delta no sono NREM subsequente (Hellman e Abel, 2007). Em humanos, foi observado um aumento da potência de Delta alta (2-4 Hz) no hipocampo durante o sono NREM subsequente ao aprendizado em uma tarefa de navegação espacial (Moroni et al. 2014). Além disso, Huber et al. 2004 mostraram que o aprendizado de tarefas que envolvem regiões específicas apresentam um aumento local na atividade de ondas lentas durante o sono NREM. Isto é uma evidência de que o processo de homeostase sináptica no sono é um fenômeno modulado de forma local. Portanto, considerando nossos resultados, o aumento significativo na potência de Delta em CA1 após o aprendizado poderia ser justificado por uma maior potenciação de sinapses da circuitaria hipocampal após a aquisição da tarefa em detrimento de circuitos neocorticais, como o mPFC. Curiosamente, em ambos os trabalhos com humanos, o desempenho dos indivíduos apresentou uma alta correlação positiva com a magnitude da potência de Delta e/ou da atividade de ondas lentas durante o sono NREM (Huber et al. 2004; Moroni et al. 2014). Da mesma forma, mostramos uma alta correlação positiva entre o aumento da potência de Delta no mPFC no sono NREM no dia D1 e o desempenho do animal na tarefa do BM. Isso indica que apesar de não haver um aumento médio significativo da potência de Delta no mPFC no dia D1, a variação individual do D1 em relação ao BL pode ser um indicativo da eficácia da consolidação da memória. Portanto, considerando nossos resultados, a atividade de ondas lentas no mPFC no sono NREM subsequente ao primeiro treino no BM é um possível marcador eletrofisiológico do processo de consolidação de memórias no BM.

Por fim, considerando a interação entre a fase de Delta e a amplitude de oscilações de maior frequência, observamos um aumento no MI do CFC Delta-HFO durante o sono NREM nos dias D1 e D3 em comparação com o BL. Este resultado mostra que não apenas a potência da oscilação Delta é aumentada, mas também que este ritmo modula as computações neurais intra-hipocampais (Engel et al. 2009). Porém, é necessário avaliar a identidade das HFOs uma vez que se encontram na faixa de frequência das *ripples* hipocampais. Nesse caso, pode ser que a fase das oscilações Delta estejam modulando a amplitude das SWRs hipocampais durante o sono NREM. Ainda, considerando que o processo de aprendizado no BM produz mudanças profundas na atividade de ondas lentas e SWRs, a interação entre estes

padrões oscilatórios pode também estar sendo afetada. Por outro lado, pode ser que o aumento no acoplamento Delta-HFO seja uma consequência do aumento de taxa de disparos e dessincronização da atividade neuronal após o aprendizado, que gera um vazamento espectral (do inglês, *spectral leakage*), fazendo com que as HFOs observadas não sejam ritmos verdadeiros. Este processo de vazamento espectral foi observado por Guyon et al. (2021) em animais deficientes de atividade inibitória por neurônios parvalbumina-positivos, com um aumento da potência na faixa de Gama. Entretanto, observou-se uma redução no índice de modulação fase-amplitude entre oscilações lentas e Gama nestes animais. Portanto, para entender melhor o fenômeno subjacente ao aumento na modulação da amplitude de HFOs pela fase de Delta após o aprendizado no BM é necessário avaliar a interação entre as SWRs e faixa de Delta, bem como validar se as HFOs são, na verdade, consequência do fenômeno de vazamento espectral.

### **5.3. A atividade de Theta em REM parece não estar associada à consolidação de memória na tarefa do BM**

A oscilação Teta é um importante elemento integrador da atividade hipocampal, estando associada à navegação e à formação de memórias declarativas (Buzsáki e Moser, 2013). O mecanismo proposto é que a atividade de Teta seria capaz de modular a atividade neuronal, sincronizando grupos celulares e regiões distintas (Kahana et al. 1999; Raghavachari et al. 2001; Lee et al. 2005). Nesse sentido, são as oscilações Teta que modulam a atividade das *place cells* hipocâmpais durante a aquisição da memória (Drieu e Zugaro, 2019) e posteriormente, durante o sono REM, a oscilação Teta seria responsável por fortalecer as representações neurais relacionadas às *place cells* que estiveram ativas durante a aquisição (Poe et al. 2000; Louie e Wilson, 2001). De fato, a potência de Teta medida em regiões corticais aumenta durante a execução de tarefas com demanda cognitiva (Klimesch et al. 1997; Nigbur et al. 2011; Maurer et al. 2015; Arnau et al. 2021).

Entretanto, trabalhos que mostram o aumento de Teta durante o sono REM como resposta ao aprendizado são escassos. Existem evidências causais que corroboram a importância da atividade de Teta durante o REM em CA1 para a consolidação de memória contextual de medo (Boyce et al. 2016). Além disso, Fogel et al. 2007, demonstraram um aumento da potência de Teta em sono REM em

registros de escalpo em humanos após uma tarefa de aprendizagem de associação pareada. Este estudo foi a primeira evidência acerca da relevância da atividade das ondas Teta no sono REM para a consolidação de memórias declarativas (Fogel et al. 2007). Ainda, há evidências de que a potência de Teta em REM sofre um declínio em resposta ao tempo despendido em sono NREM (Bjorness et al. 2018), o que pode indicar que atividade de Teta sofre algum controle homeostático semelhante à potência de Delta no sono NREM, como proposto pela SHY (Tononi e Cirelli, 2012). Entretanto, nossos resultados não demonstraram mudanças na potência de Teta durante o sono REM, tanto em CA1, quanto no mPFC, em nenhum dos dias de registro. Da mesma forma, não observamos mudanças na potência de Teta ao longo das horas de sono REM. Uma possível explicação para essa diferença é a tarefa que empregamos para testar a consolidação de memória. Infelizmente, para fins de comparação, não existem estudos que utilizem o BM e avaliem a potência de Teta durante o sono REM ao longo dos dias de aquisição da tarefa.

Sabe-se que a coerência de fase e espectral em Teta entre CA1 e mPFC aumenta durante momentos de tomada de decisão em tarefas que exigem alguma retenção de memória espacial (Jones e Wilson, 2005; Benchenane et al. 2010; Sigurdsson et al., 2010; O'Neill et al., 2013; Tavares e Tort, 2022). Portanto, avaliamos também a sincronia temporal entre CA1 e o mPFC por meio das medidas de coerência de fase e coerência espectral na faixa de Teta. Contudo, não observamos mudanças na coerência de fase ou coerência espectral entre CA1 e o mPFC no sono REM durante os dias de aquisição do BM. Por outro lado, Popa et al. (2010) demonstraram uma alta coerência espectral em REM entre a amígdala, hipocampo e mPFC, associada à consolidação de memórias aversivas. Lobato et al. (2023) também encontraram aumento de coerência espectral de Teta entre o mPFC e hipocampo durante o sono REM após aprendizagem da tarefa de objeto-espaco. Wahlstrom et al. (2018) mostraram que ativação da via entre a amígdala basolateral e o córtex entorrinal medial por estimulação optogenética em uma frequência de 8 Hz é capaz de aumentar a retenção da memória no BM. Isso é uma evidência da relevância do processamento do contexto aversivo na consolidação da memória do BM e que as oscilações Teta têm um papel relevante na comunicação entre as áreas envolvidas. Contudo, a diferença dos nossos resultados poderia ser explicada pela diferença das tarefas realizadas, considerando-se a dificuldade ou o grau de aversão do animal ao contexto. Nesse sentido, em memórias contextuais aversivas o contexto é ponto

central, evocando a memória emocional como consequência. No BM, o contexto aversivo funciona apenas com uma motivação para o animal procurar o escape. Dessa forma, a localização espacial do escape, e a sequência de tomadas de decisão para encontrar este objetivo são elementos com maior saliência nas memórias formadas no BM. Portanto, a sincronia em Teta entre o mPFC e o hipocampo pode não ter uma função tão relevante nesse caso.

Por fim, a interação de Teta com outros ritmos é importante em processos mnemônicos. Por exemplo, o CFC entre a fase de Teta e a amplitude de Gama do hipocampo de ratos aumenta à medida que os animais evocam uma memória de associação item-contexto (Tort et al. 2009). Além disso, o acoplamento entre essas oscilações é essencial para o processo de reconsolidação de memórias (Radiske et al. 2020). Ainda, esta interação entre ritmos ocorre no sono REM de roedores (Scheffzük et al. 2011). Contudo, nossos resultados não demonstram uma relevância da interação entre a fase de Teta e amplitude de Gama no processo de consolidação de memórias referentes ao BM durante o sono REM. Nesse caso, é possível que o acoplamento entre estes ritmos seja fundamental para a evocação da memória durante a execução da tarefa do BM, como visto por Tort et al. (2009).

As diferenças observadas entre os nossos resultados e aqueles reportados na literatura indicam que a potência da atividade de ondas Teta no hipocampo e mPFC durante o sono REM não é um bom preditor da eficácia da consolidação de memórias relativas ao BM. Além disso, a sincronia da atividade de Teta entre essas regiões e o acoplamento entre Teta e Gama no hipocampo parecem não ser tão relevantes ao processo de consolidação de memória referente ao BM durante o sono REM.

#### **5.4. SWRs são marcadores eletrofisiológicos do processo de consolidação de memória no BM**

Diversos trabalhos demonstram o aumento na ocorrência de SWRs no sono NREM subsequente ao aprendizado de tarefas associativas (Eschenko et al. 2008; Ramadan et al. 2009; Girardeau et al. 2014; Norimoto et al. 2018; Binder et al. 2019, Meier et al. 2020, Schmidt et al. 2021). Em nosso trabalho, observamos um aumento na ocorrência de SWRs durante o sono NREM no primeiro dia de aquisição no BM, corroborando as evidências descritas na literatura. Entretanto, até onde sabemos, o único trabalho que se propôs a avaliar a ocorrência de SWRs após aprendizado na

tarefa do BM foi realizado por Binder et al. 2019. Os autores também demonstram um aumento significativo da ocorrência de SWRs durante o sono NREM no primeiro dia de aquisição no BM em comparação com a linha de base. Apesar da inibição das SWRs hipocampais gerar um prejuízo na consolidação de memórias (Girardeau et al. 2009, 2014; Norimoto et al. 2018), não obtivemos uma correlação com tendência significativa entre a razão da ocorrência das SWRs no D1 pelo BL e o desempenho dos animais no teste do BM. Ramadan et al. 2009, por outro lado, reportaram uma forte correlação positiva entre a ocorrência de SWRs durante o sono NREM após aprendizado e o desempenho dos animais no labirinto radial nos primeiros dias de aquisição. Tais diferenças podem ser explicadas pelo tipo de tarefa realizada e a forma como o desempenho dos animais foi avaliado. Em nosso caso, o desempenho dos animais considera o tempo de exploração da região do buraco de escape do BM durante a sessão de teste, no último dia do protocolo. Já Ramadan et al. 2009 correlacionaram a ocorrência das SWRs com o número de erros cometidos em dias específicos de aquisição no labirinto radial.

Existem trabalhos que indicam um aumento da amplitude das SWRs após o aprendizado. Por exemplo, animais que experienciaram um ambiente enriquecido e mais amplo, com efeitos consideráveis na formação de memórias declarativas e espaciais (Bilkey et al., 2017), apresentam *sharp waves* com maior amplitude, mas a potência das *ripples* não é alterada (Landeck et al. 2021). Ainda, a amplitude das SW e *ripples* é aumentada após tarefas de medo condicionado e tarefas espaciais, ambas dependentes do hipocampo (Meier et al. 2020). Entretanto, em nosso trabalho, não observamos uma mudança na amplitude das SWRs através do cálculo do RMS médio dos eventos. Binder et al. 2019 também não encontraram mudanças na amplitude pico a pico das SWRs ao longo dos dias de aquisição do BM. Dessa forma, a consolidação de memórias referente ao BM parece não gerar mudanças significativas na amplitude das SWRs.

Por último, a duração das SWRs também é modulada pelo aprendizado (Eschenko et al. 2008; Fernández-Ruiz et al. 2019). A duração das SWRs aumenta no sono NREM subsequente a uma tarefa de associação odor-recompensa (Eschenko et al. 2008) e também aumenta durante o estado acordado em períodos de imobilidade, quando ratos são expostos a um novo labirinto, ou durante tarefas que exigem formação de memória espacial (Fernández-Ruiz et al. 2019). Ademais, Fernández-Ruiz et al. (2019) mostraram que o desempenho do animal no labirinto em



M, uma tarefa dependente do hipocampo, é melhorada ao se prolongar as SWRs espontâneas durante a execução da tarefa. Curiosamente, a porção prolongada das SWRs recruta novas *place-cells* de CA1 em detrimento das células com maior probabilidade de disparo. Este fenômeno aumenta a área total do labirinto representada pelas *places-cells* recrutadas durante cada uma das SWRs prolongadas (Fernández-Ruiz et al. 2019). Apesar de não avaliar a duração das SWRs durante a execução do BM, observamos um aumento na duração das SWRs durante o sono NREM no D1 em comparação ao BL. Em especial, a fração de SWRs que apresenta uma duração maior que 100 ms é maior no sono subsequente ao aprendizado no dia D1. Além disso, demonstramos uma forte correlação positiva entre o desempenho do animal no teste do BM e o aumento da fração de SWRs com duração maior que 100 ms no dia D1 em comparação com a linha de base. De forma complementar, apresentamos mais uma evidência de que o sono NREM é importante para a consolidação da memória da tarefa do BM por meio das SWRs naturalmente mais longas durante o sono subsequente ao aprendizado.

### **5.5. Ondas Delta e Spindles no mPFC são marcadores do processo de consolidação do aprendizado no BM**

Um conjunto de evidências indica um papel importante das ondas Delta em computações neurais em redes neocorticais relevantes a memórias não declarativas (Marshall et al., 2006; Ngo et al., 2013; Lustenberger et al., 2016; Miyamoto e Murayama, 2016). Além disso, várias evidências corroboram o papel das oscilações lentas e ondas Delta na consolidação de memórias declarativas durante o sono NREM. Em parte, esse papel se dá pela função de renormalização sináptica, como proposto pela SHY (Tononi e Cirelli, 2003, 2006, 2014). Tendo isso em vista, em nosso trabalho, mostramos um aumento na ocorrência de ondas Delta no mPFC no sono NREM subsequente ao primeiro e terceiro dias de aquisição no BM. De forma semelhante, Binder et al. 2019 também observaram este aumento na ocorrência de ondas Delta no mPFC logo no primeiro dia de aquisição do BM.

Spindles também estão associadas a processos de consolidação de memória procedurais (Fogel e Smith, 2006; Peters et al. 2008; Tamaki et al. 2009;), e em especial, a memórias declarativas (Gais et al. 2002; Tamminen et al. 2010; Fogel e Smith, 2011; Jegou et al. 2019). Além disso, a ocorrência destes eventos está

associada à ativação de grupos de neurônios específicos do mPFC em resposta à sinalização talâmica (Peyrache et al. 2011) e hipocampal (Peyrache et al. 2009). Assim sendo, a ocorrência de Spindles é aumentada no sono NREM como consequência ao aprendizado de tarefas dependentes de hipocampo (revisado por Peyrache e Seibt, 2020). Entretanto, nós não reportamos mudanças na ocorrência de Spindles durante o sono NREM nos dias de aquisição no BM, mas encontramos um aumento na amplitude destes eventos. Binder et al. (2019) apresentaram um aumento na ocorrência de Spindles nos registros do córtex cingulado e um aumento na amplitude destes eventos nos registros do córtex infra-límbico após o primeiro dia de aquisição no BM. A disparidade destes resultados pode se dar pela sub-região do mPFC que registramos, visto que o eletrodo se encontra posicionado no córtex pré-límbico.

Curiosamente, o aumento na ocorrência de ondas Delta e Spindles no dia D1 em relação à linha de base apresenta uma forte correlação com o desempenho dos animais no teste do BM. Com isso, nós mostramos que estes eventos oscilatórios no mPFC são possíveis marcadores eletrofisiológicos para a consolidação de memórias referentes ao BM.

### **5.6. A comunicação CA1-mPFC durante o sono NREM suporta o processo de consolidação de memórias no BM**

Evidências indicam que, para memórias declarativas, os padrões oscilatórios e atividade neuronal neocorticais estão fortemente atrelados à atividade hipocampal durante o sono NREM (Wei et al. 2016; Maingret et al. 2016; Todorova e Zugaro, 2019). Maingret et al. (2016) demonstram um aumento no acoplamento das SWRs hipocampais e as ondas Delta e Spindle no mPFC durante o sono NREM subsequente ao aprendizado de uma tarefa dependente de hipocampo. Ainda, reforçar esse acoplamento no sono subsequente à aquisição, promove uma melhoria no desempenho dos animais (Maingret et al. 2016). Nossos dados corroboram, em parte, estes resultados. Para a tarefa do BM mostramos um aumento de ondas Delta no mPFC acopladas a SWRs hipocampais (e vice-versa) no primeiro dia de aquisição do BM. Contudo, não observamos mudanças no acoplamento entre ondas Delta e Spindles e nem no acoplamento entre SWRs, Deltas e Spindles. Nesse caso, nosso trabalho é o primeiro a mostrar estes resultados, uma vez que Binder et al. (2019) não

se propuseram a avaliar apenas o efeito do aprendizado no acoplamento entre SWRs, ondas Delta e Spindle. Por outro lado, os autores compararam um grupo controle e um grupo cujas projeções monossinápticas entre CA1 ventral e mPFC foram bloqueadas durante o sono NREM pós-aprendizado. Nesse caso, mostraram um aumento no acoplamento entre ondas Delta e Spindles e entre Spindles e SWRs. Um possível motivo para não conseguirmos demonstrar um aumento no acoplamento entre Deltas e Spindles e/ou SWRs, Deltas e Spindles é o posicionamento de um único eletrodo monopolar no mPFC. Nesse sentido, a ocorrência e a detecção de Spindles varia conforme a sub-região do mPFC que está sendo registrada (Binder et al. 2019) e em nosso trabalho registramos apenas a região pré-límbica do mPFC.

Por fim, corroboramos a relevância da comunicação hipocampo-mPFC na consolidação do aprendizado no BM demonstrando uma forte correlação positiva do desempenho do animal no dia do teste com o aumento do acoplamento entre Delta-SWRs no primeiro dia de aquisição em comparação com a linha de base.

### **5.7. SWRs parecem ser reguladas homeostaticamente de forma semelhante à atividade de ondas lentas no sono NREM**

Segundo a SHY, proposta por Tononi e Cirelli (Tononi e Cirelli, 2003, 2006 e 2014), a amplitude das ondas lentas corticais durante o sono NREM reflete o nível de sua conectividade após períodos prolongados de alerta. Tal padrão oscilatório de baixa frequência parece ser fundamental para a renormalização global da força sináptica (Siddoway, et al. 2014; González-Rueda, et al. 2018). Neste estudo, observamos que a ocorrência de eventos de SWRs durante o sono NREM segue uma dinâmica muito similar àquela observada nas ondas lentas corticais (ver **Figura 28**). Portanto, as SWRs parecem ser homeostaticamente reguladas, assim como as ondas lentas. Tal hipótese é suportada, ainda que indiretamente, por alguns estudos anteriores. Girardeau et al. 2014 mostraram um aumento na ocorrência de SWRs após o aprendizado de uma tarefa espacial. Além disso, os autores observaram um aumento na ocorrência de SWRs, mediante inibição destes eventos por estimulação elétrica. Norimoto et al. 2018 mostraram que o grupo de animais que teve as SWRs silenciadas durante as 7 horas após o aprendizado apresentaram uma alta incidência de SWRs em comparação com o grupo controle, uma vez que a inibição foi cessada. Ainda, Binder et al. 2019 mostraram que ao inibir as projeções monossinápticas entre

o hipocampo ventral/intermediário e o mPFC durante o sono NREM subsequente à aquisição no BM, os animais apresentam um aumento na ocorrência de SWRs durante os dois primeiros dias de aquisição em comparação com o grupo controle. Tendo isso em vista, acreditamos que o aumento da ocorrência das SWRs como consequência ao bloqueio destes eventos é um efeito análogo ao aumento da atividade de ondas lentas como consequência a um período de privação de sono, por exemplo. Nesse sentido, Giri et al. (2023) mostraram que a ocorrência de SWRs durante um período de privação de sono após a exposição do animal a um novo ambiente se mantém elevada em comparação ao grupo de animais que dormem.

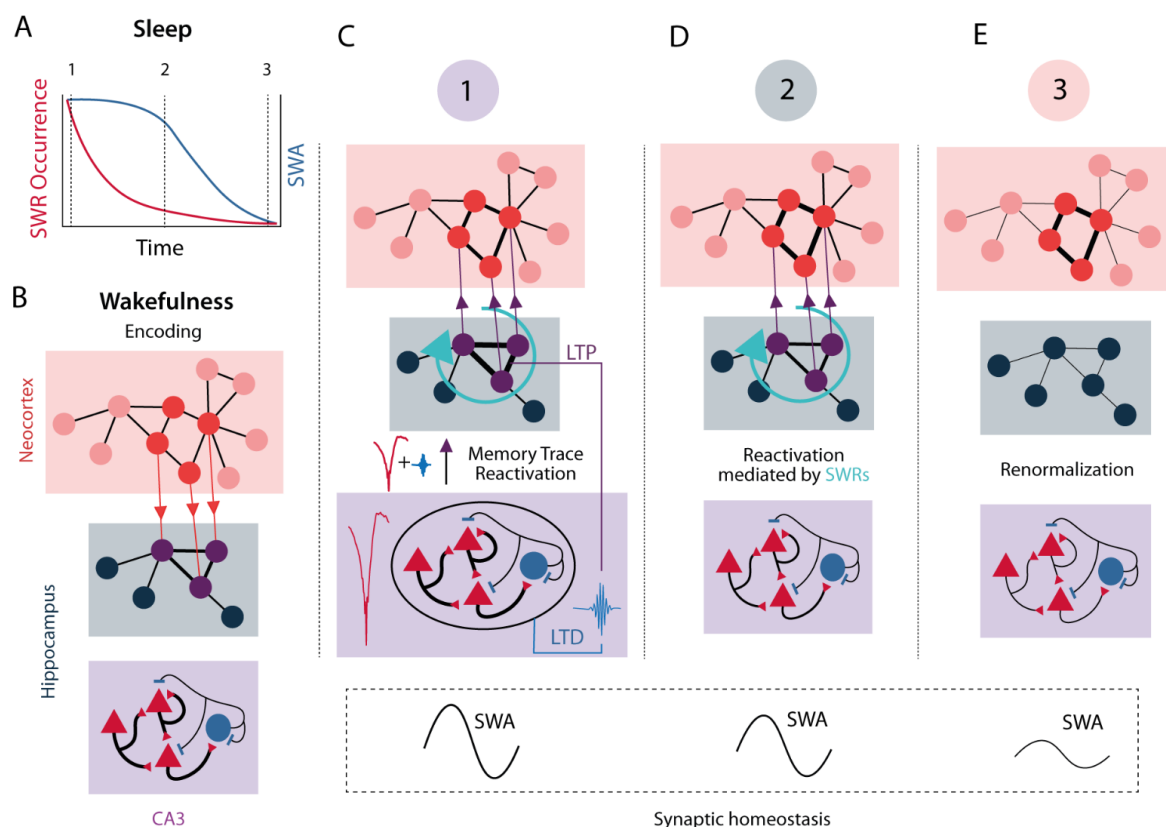
Os mecanismos subjacentes a este fenômeno de ajuste homeostático de SWRs ainda não são compreendidos. Schlingloff et al. (2014) demonstraram que as SWRs são iniciadas com células piramidais espontaneamente ativas que criam um acúmulo de atividade na circuitaria neural recorrente de CA3, que ativa *basket cells* inibitórias e que inibem as células piramidais. Esse padrão de ativação-inibição recíproca gera o padrão de ativação neural na frequência das *ripples* e o padrão oscilatório do potencial de campo. Levando isso em consideração, assumimos que após o aprendizado tem-se uma rede hipocampal com sinapses fortalecidas (Tononi e Cirelli, 2003, 2006), facilitando assim o acúmulo de atividade na rede recorrente de CA3 e aumentando a probabilidade de ocorrência das SWRs (Eschenko et al. 2008; Girardeau et al. 2014; Buzsáki et al. 2015). Isso pode também explicar o motivo da inibição das SWRs gerar um efeito 'rebote' em sua ocorrência (Girardeau et al. 2014; Norimoto et al. 2018). Dessa forma, nós apresentamos neste trabalho uma evidência para tal hipótese: uma forte correlação positiva entre a ocorrência de SWRs e a potência da banda de Delta no mPFC e em CA1 durante o sono NREM dos animais ao longo das horas de todos os dias de registro (ver **Figura 28**).

Contudo, acreditamos que o processo de aprendizado modifica o padrão temporal de queda na ocorrência de SWRs hipocampais a partir do primeiro dia de aquisição no BM, mas não da potência de Delta em CA1 e mPFC. O processo de aprendizado produz uma maior demanda de ocorrência de SWRs no início do sono NREM subsequente ao aprendizado desproporcionalmente ao aumento da atividade de ondas lentas (Girardeau et al. 2014). Este aumento desproporcional da ocorrência de SWRs em relação à atividade de ondas lentas poderia ser explicado pelo hipocampo ser uma região com demandas únicas durante o sono NREM pós-aprendizado: 1 - garantir que representações neurais relevantes sejam mantidas e

transferidas ao neocórtex (Wei et al. 2016; Maingret et al. 2016; Todorova e Zugaro, 2019); 2 - apagar informações irrelevantes para poder receber novas informações durante a vigília (como proposto pela SHY). Assim, as SWRs seriam janelas de oportunidade únicas que permitiriam ao hipocampo cumprir estes dois papéis sem que haja um comprometimento da informação pelo processo de homeostase sináptica global. Nesse sentido, já foi observado que padrões de atividade neural no mPFC relacionados a um aprendizado específico são repetidos durante eventos de SWRs hipocampais durante o sono NREM (Peyrache et al. 2009). Além disso, por meio de simulações computacionais, Wei et al. 2016 mostraram que redes neocorticais apresentam alterações nos pesos sinápticos quando um estímulo simulando SWRs é aplicado em neurônios específicos. Tais alterações nos pesos sinápticos eram mantidas a longo prazo, geraram a reativação de células específicas e foram dependentes de quais neurônios recebiam a estimulação. Assim, estes achados são evidências para a função que SWRs têm em remodelar as redes neocorticais, e por consequência, transferir e armazenar informações a longo prazo.

Dessa forma, baseado nas evidências anteriores fornecidas por Norimoto et al. (2018) e Zhou e Norimoto (2023), propomos que exista uma sinergia entre a SWRs e a atividade de ondas lentas, a saber: 1 - As SWRs hipocampais, com maior ocorrência após o aprendizado, promovem a potenciação de sinapses relevantes às representações neurais da memória no hipocampo (Sadowski et al. 2014; Yang et al. 2024) e a reativação de engramas neocorticais (Wei et al. 2016; Todorova e Zugaro, 2019) logo no início do sono. Ainda, as SWRs promovem uma renormalização global das sinapses hipocampais (Norimoto et al. 2018), aumentando a razão sinal/ruído e garantindo que a comunicação hipocampo-neocórtex seja efetiva. Reiteramos também que a ocorrência das SWRs, por sua vez, é homeostaticamente regulada pela potenciação sináptica da rede hipocampal após o aprendizado. Portanto, as sinapses que formam as representações hipocampais e neocorticais da memória são fortalecidas, impedindo a perda de informação; 2 - A atividade neural em '*burst*' promovida pela alternância entre *up* e *down states* durante o sono NREM é capaz de promover a depressão de potenciais pós-sinápticos excitatórios (Czarnecki et al., 2007; Tononi e Cirelli, 2014). Este mecanismo pode estar ligado ao desacoplamento entre neurônios durante períodos de '*burst*', resultando em depressão sináptica (Lubenov e Siapas, 2008; Tononi e Cirelli, 2014). Portanto, a atividade de ondas lentas promove uma renormalização gradual e global das sinapses ao longo do período de

sono restante (Tononi e Cirelli, 2003, 2006 e 2014). Dessa forma, os traços de memória fortalecidos são mantidos em detrimento das sinapses irrelevantes (**Figura 29**).



**Figura 29 - Relação temporal entre a ocorrência de SWRs e a atividade de ondas lentas.** **A** - Durante o período de sono observa-se um padrão de queda na ocorrência de SWRs (vermelho) e na atividade de ondas lentas (SWA, em azul). Contudo, o padrão de queda difere entre estes dois parâmetros eletrofisiológicos. **B** - Durante o estado acordado, memórias são codificadas formando traços de memória no hipocampo (armazenamento temporário) e em regiões neocorticais (armazenamento a longo prazo). A rede neural recorrente de CA3 apresenta neurônios piramidais (triângulo vermelho) e *basket cells* parvalbumina-positivas (círculo azul). Como consequência às experiências vividas durante a vigília e ao aprendizado, há um aumento da eficácia sináptica global (destacado pela espessura das conexões entre os neurônios). **C** - No início do sono subsequente ao aprendizado, existe uma maior atividade de ondas lentas em consequência à saturação sináptica promovida durante o estado acordado. Além disso, há uma maior ocorrência de SWRs devido a uma maior excitabilidade das redes recorrentes de CA3. Por consequência, as SWRs promovem LTD nas sinapses hipocâmpais, porém, promovem LTP em conexões que formam engramas hipocâmpais relevantes. Ademais, as representações neurais hipocâmpais são reativadas durante as SWRs e as representações neocorticais são fortalecidas. **D** - Posteriormente, por meio do processo de homeostase sináptica durante o sono (que no hipocampo pode ser mediado pela ação das SWRs), o hipocampo

apresenta uma eficácia sináptica reduzida na circuitaria geradora de SWRs. Consequentemente, há uma menor excitabilidade das redes recorrentes de CA3 e uma ocorrência de SWRs reduzida. Entretanto, a comunicação hipocampo-neocórtex durante SWRs ainda atua na consolidação das representações neocorticais da memória. Ainda, o peso das conexões sinápticas é renormalizado globalmente (como descrito pela SHY), mantendo as representações neocorticais que foram fortalecidas previamente. E - O período de sono chega ao fim, a ocorrência de SWRs retorna ao padrão basal, bem como a atividade de ondas lentas. A circuitaria hipocampal é renormalizada e os engramas neocorticais armazenam a memória a longo prazo.

## **6. Conclusões**

O aprendizado gera mudanças profundas nas redes hipocampais e neocorticais. Aqui demonstramos que o processo de aquisição na tarefa de Barnes Maze produz apenas mudanças pontuais na arquitetura do sono. Por outro lado, observamos mudanças significativas nas características espectrais do sinal, com o aumento da potência da banda Delta em CA1 e no mPFC. Apesar de não termos observado variações na coerência de fase ou coerência espectral entre CA1 e mPFC durante o sono, o processo de aprendizado no Barnes Maze parece ter produzido alterações nas redes hipocampais e neocorticais, aumentando não só a ocorrência de ondas Delta no mPFC e SWRs hipocampais, mas a ocorrência conjunta destes eventos. Em especial, mostramos que a atividade de ondas lentas, a duração das SWRs, a ocorrência de ondas Delta, Spindles e ondas Delta acopladas a SWRs podem ser possíveis marcadores eletrofisiológicos da consolidação inicial de memórias relativas ao aprendizado no BM. Portanto, este trabalho corrobora a relevância das SWRs, Spindles e ondas Delta em processos mnemônicos, e em especial, destaca a relevância da comunicação entre CA1 e o mPFC no processo de consolidação de memórias durante o sono.

## **7. Próximos passos**

Nosso trabalho corrobora resultados já descritos na literatura e apresenta novas informações acerca do processo de consolidação de memórias durante o sono. Entretanto, existem alguns detalhes no paradigma experimental e análises que precisam ser ajustados.

Neste trabalho, avalia-se o efeito do aprendizado no BM em dias de aquisição distintos sobre marcadores eletrofisiológicos putativos do processo de consolidação de memórias durante o sono. Contudo, para ter resultados mais robustos seria necessário ter um grupo controle para o aprendizado. Os animais deste grupo passariam por um protocolo de aquisição alternativo, em que a cada sessão de aquisição o local de escape seria alterado. Dessa forma, os animais não formariam uma memória da localização do escape, e por consequência, conseguiríamos distinguir os efeitos do aprendizado de um objetivo espacial e os efeitos produzidos pela execução da tarefa. Além disso, considerando a variabilidade no comportamento animal e os resultados de outros trabalhos que empregam a tarefa do Labirinto de Barnes, faz-se necessário aumentar o tamanho amostral do nosso estudo.

Além disso, algumas análises mais refinadas poderiam ser aplicadas a fim de entender melhor a atividade de CA1 e mPFC e a comunicação entre tais regiões. Por exemplo, a análise da causalidade de Granger poderia ser aplicada na avaliação da direcionalidade da comunicação entre CA1 e o mPFC. Nesse sentido, seria interessante observar como a atividade de CA1 produz um efeito causal sobre a atividade do mPFC (e vice-versa) ao longo dos dias de aquisição no BM. Ainda, é importante definir se o aumento da modulação da amplitude das oscilações de alta frequência pela fase das oscilações Delta no hipocampo é uma consequência da atividade de *ripples* sincronizadas com a fase de ondas Delta.

Por fim, um dos nossos objetivos iniciais foi estudar marcadores moleculares do processo de corticalização de memórias. Portanto, coletamos amostras de tecido do hipocampo dorsal e do mPFC de ratos em dias distintos de aquisição do protocolo do Labirinto de Barnes. Posteriormente, estas amostras serão processadas e um protocolo de proteômica quantitativa será executado. Desta forma, será possível identificar os grupos funcionais de proteínas relevantes à atividade neural e a processos plásticos que apresentam abundância alterada nas regiões alvo do nosso estudo em momentos distintos do processo de corticalização de memórias. Portanto, um dos próximos passos é finalizar o protocolo de proteômica quantitativa e analisar os dados obtidos.

## **8. Material suplementar**



## 8.1. Caracterização do registro de linha de base (BL)

Avaliamos o registro de linha de base (BL) a fim de ter uma descrição das características do ciclo sono vigília, parâmetros espectrais, sincronia entre regiões e eventos oscilatórios relevantes aos processos mnemônicos antes de qualquer exposição do animal a um novo aprendizado.

### 8.1.1. Arquitetura do sono

O tempo despendido médio em sono NREM foi de 60.47% (SD:6.2), em REM, 14.85% (SD:2.15) e no estado WK, 23.10% (SD:5.14) (**Figura S1A**). O número de bouts por minuto médio foi de 0.36 (SD: 0.04) para o sono NREM, 0.16 (SD:0.03) para o sono REM e 0.14 (SD:0.02) para o estado WK (**Figura S1B**). A duração dos bouts média foi de 96.91 segundos (SD: 11) para o sono NREM, 43.81 segundos (SD: 8.11) para o REM e 78 segundos (SD: 17.51) para o estado WK (**Figura S1C**). A latência média para o início do sono foi de 36.07 minutos (SD: 25.20) e para o início do sono REM foi de 11.13 minutos (SD: 6.687) (**Figura S1D**). A eficiência do sono média foi 72.36% (SD: 4.5) (**Figura S1E**).

### 8.1.2. Densidade espectral de potência (PSD)

A PSD da linha de base para o mPFC apresentou alta potência na faixa de Delta para o sono NREM, alta potência na faixa de Teta e Gama para REM e WK (**Figura S1F**). No mPFC, a potência de Delta no sono NREM não apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das seis horas de registro [One-way-ANOVA; Horas:  $F(1,640, 6,561) = 4,038$ ;  $P=0,0766$ , post hoc Tukey test:  $p>0.05$ ] (**Figura S1G**). A potência de Teta em REM aumentou entre a terceira e quinta horas de registro [3vs5:  $-0,01731$ ; One-way-ANOVA; Horas:  $F(1,697, 6,789) = 7,11$ ;  $P=0,0240$ , post hoc Tukey test: 3vs5  $p=0.0315$ ] (**Figura S1H**). A PSD da linha de base para CA1 apresentou alta potência na faixa de Delta para o sono NREM, alta potência na faixa de Teta para REM e Gama para o WK (**Figura S1J**). Em CA1, a potência de Delta no sono NREM foi reduzida entre a terceira e sexta hora de registro [Mean diff: 3vs6:  $0.02784$ ; One-way-ANOVA; Horas:  $F(1,758, 7,031) = 5,005$ ;  $P=0,0474$ , post hoc Tukey test: 3vs6:  $p=0,0284$ ] (**Figura S1K**). A potência em Teta aumentou entre a

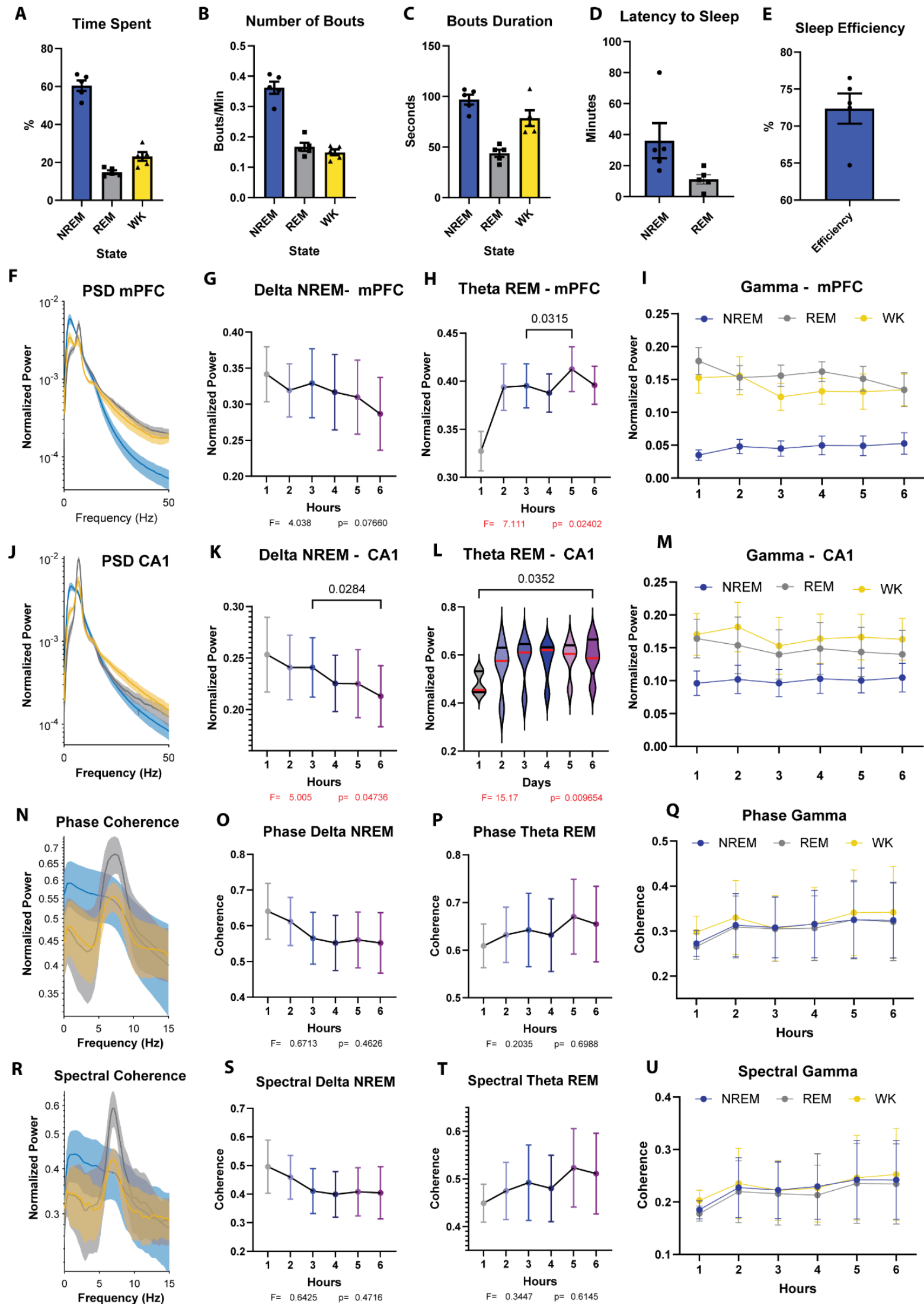
primeira e sexta hora de registro [Rank diff 1vs6: -18.00; Friedman statistic = 15.17;  $P=0.0097$ , Dunn's multiple comparisons test: 1vs6:  $p=0.0352$ ] (**Figura S1L**).

### 8.1.3. Coerência de Fase entre CA1 e o mPFC

O registro de linha de base apresentou uma coerência de fase média elevada entre CA1 e mPFC na faixa de Delta durante o sono NREM. Além disso, houve um pico na coerência de fase média na faixa de Teta durante o sono REM e o estado WK (**Figura S1N**). Ao avaliar a coerência de fase ao longo das horas de registro, não foi observado nenhuma mudança estatisticamente significativa na coerência de fase na faixa Delta durante o sono NREM [One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.037, 4.148) = 0.6713$ ;  $P=0.4626$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura S1O**), nem na coerência de fase na faixa Teta durante o sono REM [One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.056, 4.222) = 0.3047$ ;  $P=0.6207$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura S1P**).

### 8.1.4. Coerência Espectral

De forma similar, o registro de linha de base apresentou uma coerência de fase média elevada entre CA1 e mPFC na faixa de Delta durante o sono NREM. Além disso, houve um pico na coerência de fase média na faixa de Teta durante o sono REM e o estado WK (**Figura S1R**). Ao avaliar a coerência de fase ao longo das horas de registro, não foi observado nenhuma mudança estatisticamente significativa na coerência espectral na faixa Delta durante o sono NREM [One-way-ANOVA;  $F(1.033, 4.134) = 0.6425$ ;  $P=0.4716$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura S1S**), nem na coerência espectral na faixa Teta durante o sono REM [One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.056, 4.225) = 0.08657$ ;  $P=0.7956$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] (**Figura S1T**).

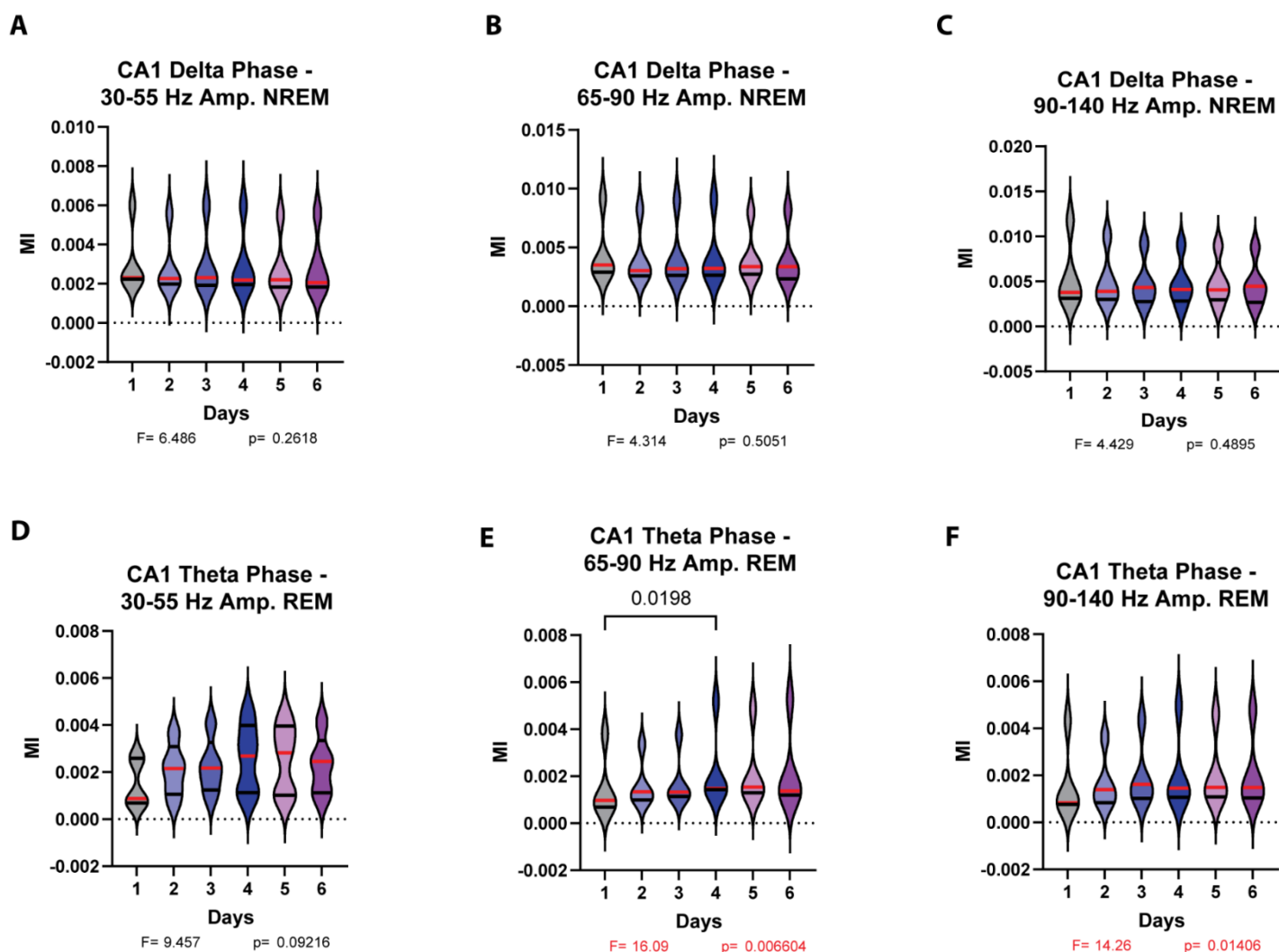


**Figura S1 - Arquitetura do sono, características espectrais e coerência entre CA1 e mPFC no registro de linha de base.** **A** - Tempo médio despendido em cada um dos estados do ciclo sono-vigília. **B** - Número de *bouts* médio de cada um dos estados do ciclo sono-vigília. **C** - Duração média dos *bouts* de cada um dos estados do ciclo sono-vigília. **D** - Latência média para o início do sono. **E** - Latência média para início do sono REM. **F** - PSD média das épocas de cada um dos estados no mPFC. **G** - Potência média da faixa de Delta no mPFC durante o sono NREM ao longo das horas de registro. **H** - Potência média da faixa de Teta no mPFC durante o sono REM ao longo das horas de registro. **I** - Potência média da faixa de Gamma no mPFC durante o sono NREM, REM e estado acordado ao longo das horas de registro. **J** - PSD média das épocas de cada um dos estados em CA1. **K** - Potência média da faixa de Delta em CA1 durante o sono NREM ao longo das horas de registro. **L** - Potência média da faixa de Teta em CA1 durante o sono REM ao longo das horas de registro. **M** - Potência média da faixa de Gamma em CA1 durante o sono NREM, REM e estado acordado ao longo das horas de registro. **N** - Coerência de fase média entre CA1 e mPFC ao longo do espectro de frequência para cada estado do ciclo sono vigília. **O** - Coerência de fase média da faixa de Delta no mPFC durante o sono NREM ao longo das horas de registro. **P** - Coerência de fase média da faixa de Teta no mPFC durante o sono REM ao longo das horas de registro. **Q** - Coerência de fase média da faixa de Gamma no mPFC durante o sono NREM, REM e estado acordado ao longo das horas de registro. **R** - Coerência espectral média entre CA1 e mPFC ao longo do espectro de frequência para cada estado do ciclo sono vigília. **S** - Coerência espectral média da faixa de Delta em CA1 durante o sono NREM ao longo das horas de registro. **T** - Coerência espectral média da faixa de Teta em CA1 durante o sono REM ao longo das horas de registro. **U** - Coerência espectral média da faixa de Gamma em CA1 durante o sono NREM, REM e estado acordado ao longo das horas de registro. Em **F, J, N** e **R**, os traçados azuis representam o sono NREM, os cinzas, o sono REM, e os amarelos, o estado acordado. A área sombreada é o erro padrão da média. **Obs:** Em todos os gráficos com barras de erro, estas indicam o erro padrão da média.

### 8.1.5. Acoplamento de frequência cruzada

Inicialmente, avaliamos a intensidade da modulação da fase das oscilações Delta sobre a amplitude das oscilações Gama baixa (30-55 Hz), Gama alta (65-90 Hz) e oscilações de alta frequência (HFO: 90-140 Hz) durante o sono NREM. Não observamos mudanças estatisticamente significativas no índice de modulação da amplitude da faixa de Gama baixa pela fase de Delta ao longo das horas de registro [Friedman statistic=6.486 p=0.2618 Dunn's multiple comparisons test:  $p>0.05$ ] (**Figura S2A**). De forma semelhante, não houve alterações no índice de modulação da amplitude da faixa de Gama alta pela fase de Delta ao longo dos dias [Friedman statistic  $F= 4.314$  p= 0.5051; Dunn's multiple comparisons test:  $p>0.05$ ] (**Figura S2B**) e nem no índice de modulação da amplitude de HFO pela fase de Delta [Friedman statistic  $F= 4.429$  p= 0.4895; Dunn's multiple comparisons test:  $p>0.05$ ] (**Figura S2C**).

Posteriormente, avaliamos a intensidade da modulação da fase das oscilações Teta sobre a amplitude das oscilações Gama baixa (30-55 Hz), Gama alta (65-90 Hz) e oscilações de alta frequência (HFO: 90-140 Hz) durante o sono REM. Não observamos mudanças estatisticamente significativas no índice de modulação da amplitude da faixa de Gama baixa pela fase de Teta ao longo das horas de registro [Friedman statistic  $F= 9.457$  p= 0.09216; Dunn's multiple comparisons test:  $p>0.05$ ] (**Figura S2D**). Contudo, observamos um aumento no índice de modulação da amplitude da faixa de Gama alta pela fase de Teta na hora 4 em comparação com a hora 1 [Rank sum diff 1 vs. 4 = -19.00; Friedman statistic  $F= 16.09$  p= 0.006604, Dunn's multiple comparisons test 1 vs. 4 p=0.0198] (**Figura S2E**). Observamos também uma diferença estatisticamente significativa no índice de modulação da amplitude da faixa de HFO pela fase de Teta ao longo das horas de registro. Entretanto, o teste post hoc não foi capaz de identificar entre quais horas essa diferença se encontra [Friedman statistic  $F= 14.26$  p= 0.01406, Dunn's multiple comparisons test  $p>0.05$ ] (**Figura S2F**).

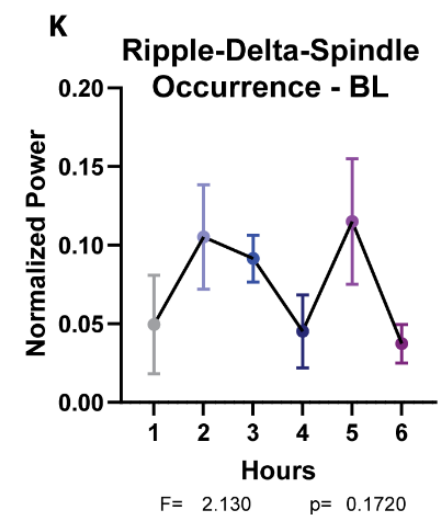
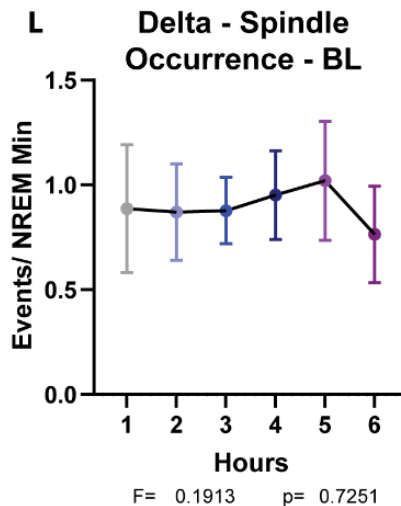
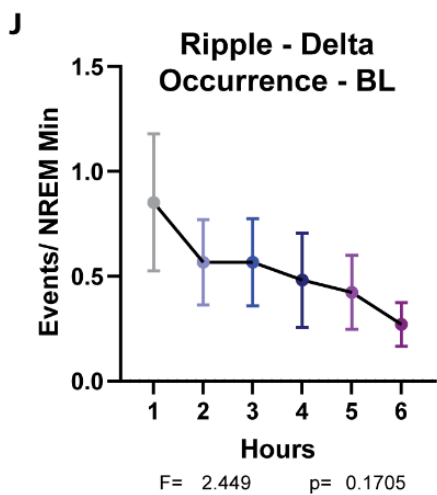
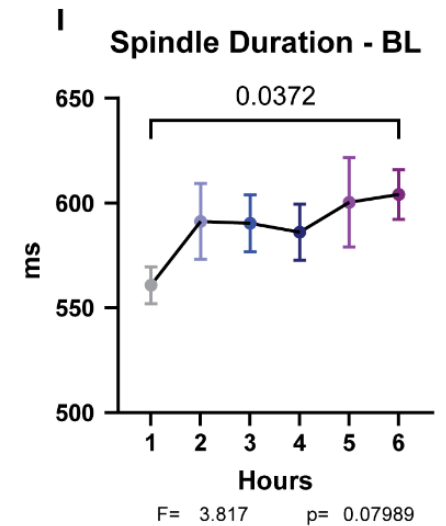
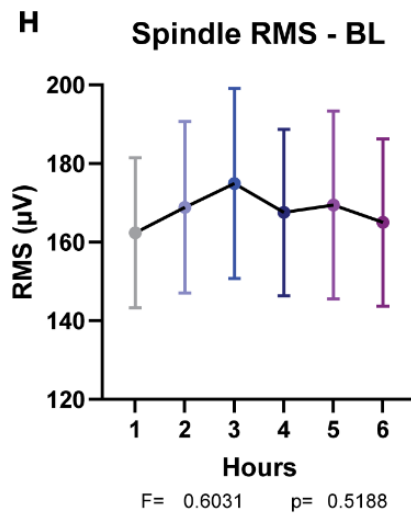
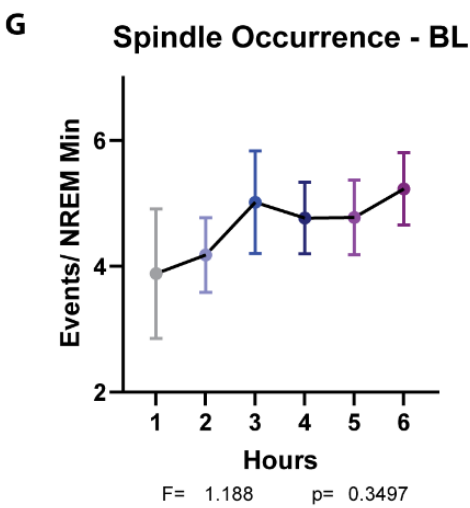
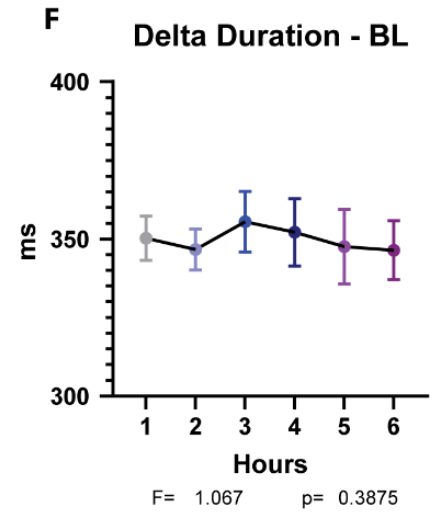
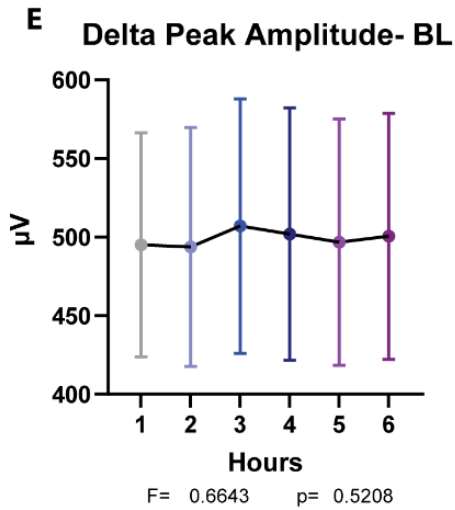
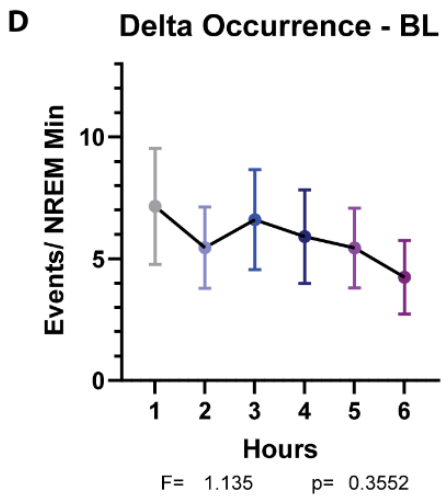
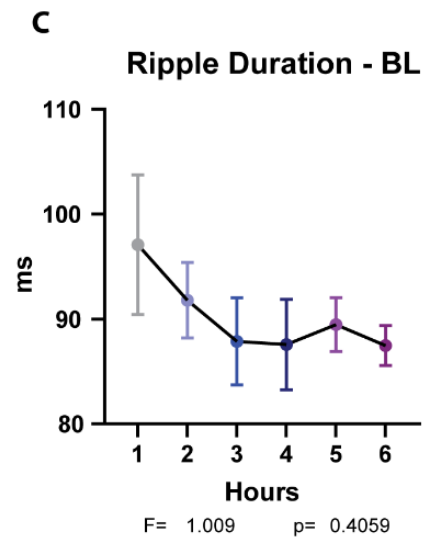
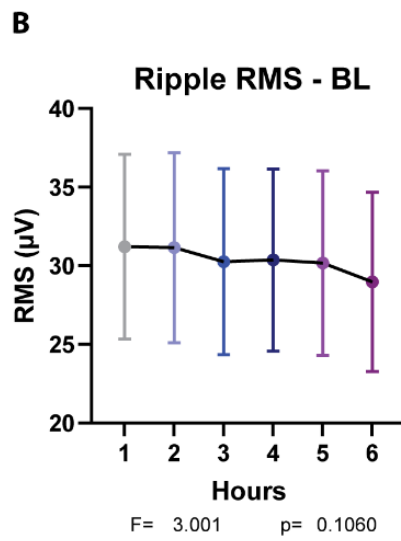
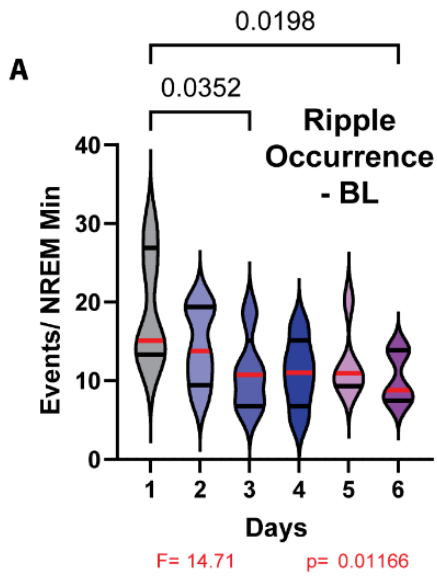


**Figura S2 - Acoplamento de frequência cruzada fase-amplitude em CA1 durante o registro de linha de base.** **A** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 30-55 Hz pela banda Delta durante o sono NREM. **B** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 65-90 Hz pela banda Delta durante o sono NREM. **C** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 90-140 Hz pela banda Delta durante o sono NREM. **D** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 30-55 Hz pela banda Teta durante o sono REM. **E** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 65-90 Hz pela banda Teta durante o sono REM. **F** - Índice de modulação médio da amplitude da faixa 90-140 Hz pela banda Teta durante o sono REM.

### 8.1.6. Eventos oscilatórios relevantes a processos mnemônicos

Ao avaliar a ocorrência e características das SWR, ondas Delta e Spindles, encontramos uma redução na ocorrência das SWR ao longo das horas de registro (1vs3 e 1vs6) [Rank diff 1vs3: 18.00, 1vs6: 19.00 Friedman statistic = 14.71;  $P=0.0117$ , Dunn's multiple comparisons test: 1vs3:  $p=0.0352$ , 1vs6:  $p=0.0198$ ] (**Figura S3A**). Contudo, o RMS médio [One-way-ANOVA; Horas:  $F(2.013, 8.051) = 3.001$ ;  $P=0.1060$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] e a duração média [One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.830, 7.319) = 0.8650$ ;  $P=0.4505$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] das SWR do registro de linha de base não apresentaram alterações estatisticamente significativas (**Figura S3B e C**). Além disso, não encontramos alterações estatisticamente significativas na ocorrência [One-way-ANOVA; Horas:  $F(2.590, 10.36) = 0.4762$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] amplitude de pico [One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.687, 6.748) = 0.5208$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] e duração [RM One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.938, 7.750) = 1.067$ ;  $P=0.3875$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] das ondas Delta detectadas ao longo das horas de registro (**Figura S3D, E e F**). Por fim, não observamos alterações estatisticamente significativas na ocorrência [RM One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.600, 6.400) = 1.188$ ;  $P=0.3497$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ], RMS [RM One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.351, 5.402) = 0.6031$ ;  $P=0.5188$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] e duração [RM One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.732, 6.928) = 3.817$ ;  $P=0.0799$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] das Spindles detectadas ao longo das horas de registro (**Figura S3G, H e I**).

Em relação ao acoplamento temporal destes eventos oscilatórios, não observamos mudanças estatisticamente significativas na ocorrência de Ripple-Delta [RM One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.469, 5.878) = 2.449$ ;  $P=0.1705$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ], Delta-Spindle [RM One-way-ANOVA; Horas:  $F(1.206, 4.825) = 0.1913$ ;  $P=0.7251$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ], ou Ripple-Delta-Spindle [RM One-way-ANOVA; Horas:  $F(2.272, 9.088) = 2.130$ ;  $P=0.1720$ , post hoc Tukey test  $p>0.05$ ] acoplados ao longo das horas de registro (**Figura S3J, K e L**).





**Figura S3 - Características das SWRs, Delta e Spindles durante o registro de linha de base.** **A** - Ocorrência média de SWRs ao longo do registro de linha de base. **B** - RMS médio das SWRs ao longo do registro de linha de base. **C** - Duração média das SWRs ao longo do registro de linha de base. **D** - Ocorrência média de ondas Delta ao longo do registro de linha de base. **E** - Amplitude de pico médio das ondas Delta ao longo do registro de linha de base. **F** - Duração média das ondas Delta ao longo do registro de linha de base. **G** - Ocorrência média de Spindles ao longo do registro de linha de base. **H** - RMS médio das Spindles ao longo do registro de linha de base. **I** - Duração média das Spindles ao longo do registro de linha de base. **J** - Ocorrência média do acoplamento entre SWRs e ondas Delta ao longo do registro de linha de base. **K** - Ocorrência média do acoplamento entre ondas Delta e Spindles ao longo do registro de linha de base. **L** - Ocorrência média do acoplamento entre SWRs, ondas Delta e Spindles ao longo do registro de linha de base. Em **B-L**, as barras de erro representam o erro padrão da média.

## 9. Referências

1. Adamantidis AR, Gutierrez Herrera C, Gent TC. Oscillating circuitries in the sleeping brain. *Nat Rev Neurosci* 20: 746–762, 2019. doi: 10.1038/s41583-019-0223-4.
2. Almeida-Filho DG, Queiroz CM, Ribeiro S. Memory corticalization triggered by REM sleep: mechanisms of cellular and systems consolidation. *Cell Mol Life Sci* 75: 3715–3740, 2018. doi: 10.1007/s00018-018-2886-9.
3. Almeida-Filho DG, Queiroz CM, Ribeiro S. Memory corticalization triggered by REM sleep: mechanisms of cellular and systems consolidation. *Cell Mol Life Sci* 75: 3715–3740, 2018. doi: 10.1007/s00018-018-2886-9.
4. Ambrosini M V, Giuditta A. Learning and sleep: the sequential hypothesis. *Sleep Med Rev* 5: 477–490, 2001. doi: 10.1053/smrv.2001.0180.
5. Andino-Pavlovsky V, Souza AC, Scheffer-Teixeira R, Tort ABL, Etchenique R, Ribeiro S. Dopamine modulates delta-gamma phase-amplitude coupling in the prefrontal cortex of behaving rats. *Front Neural Circuits* 11, 2017. doi: 10.3389/fncir.2017.00029.
6. Anghel L, Ciubară A, Nechita A, Nechita L, Manole C, Baroiu L, Ciubară AB, Mușat CL. Sleep Disorders Associated with Neurodegenerative Diseases. *Diagnostics* 13: 1–17, 2023. doi: 10.3390/diagnostics13182898.

7. Arnau S, Brümmer T, Liegel N, Wascher E. Inverse effects of time-on-task in task-related and task-unrelated theta activity. *Psychophysiology* 58: 1–15, 2021. doi: 10.1111/psyp.13805.
8. Arzilli C, Cerasuolo M, Conte F, Bittoni V, Gatteschi C, Albinni B, Giganti F, Ficca G. The Effect of Cognitive Activity on Sleep Maintenance in a Subsequent Daytime Nap. *Behav Sleep Med* 17: 552–560, 2019. doi: 10.1080/15402002.2018.1425870.
9. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93: 74–104, 1979. doi: 10.1037/h0077579.
10. Basic A, Sleep T, Science C. ACOUSTIC ENHANCEMENT OF SLEEP SLOW OSCILLATIONS NESTED TO SPINDLES RELATIVE TO DELTA WAVES IMPROVES MEMORY CONSOLIDATION [Online]. *a77 Sleep* 45: 2021–2022, 2021. <https://ouraring.com/>.
11. Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 4: 389–399, 1994. doi: 10.1016/0959-4388(94)90101-5.
12. Benchenane K, Peyrache A, Khamassi M, Tierney PL, Gioanni Y, Battaglia FP, Wiener SI. Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal- prefrontal network upon learning. *Neuron* 66: 921–936, 2010. doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.013.
13. Benkirane O, Delwiche B, Mairesse O, Peigneux P. Impact of Sleep Fragmentation on Cognition and Fatigue. *Int J Environ Res Public Health* 19, 2022. doi: 10.3390/ijerph192315485.
14. Beraldo IJ da S, Prates Rodrigues M, Polanczyk RS, Verano-Braga T, Lopes-Aguiar C. Proteomic-Based Studies on Memory Formation in Normal and Neurodegenerative Disease-Affected Brains BT - Mass Spectrometry-Based Approaches for Treating Human Diseases and Diagnostics. In: , edited by Verano-Braga T. Springer International Publishing, p. 129–158.
15. Bersagliere A, Pascual-Marqui RD, Tarokh L, Achermann P. Mapping Slow Waves by EEG Topography and Source Localization: Effects of Sleep Deprivation. *Brain Topogr* 31: 257–269, 2018. doi: 10.1007/s10548-017-0595-6.

16. Bilkey DK, Cheyne KR, Eckert MJ, Lu X, Chowdhury S, Worley PF, Crandall JE, Abraham WC. Exposure to complex environments results in more sparse representations of space in the hippocampus. *Hippocampus* 27: 1178–1191, 2017. doi: 10.1002/hipo.22762.
17. Binder S, Mölle M, Lippert M, Bruder R, Aksamaz S, Ohl F, Wiegert JS, Marshall L. Monosynaptic hippocampal-prefrontal projections contribute to spatial memory consolidation in mice. *J Neurosci* 39: 6978–6991, 2019. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2158-18.2019.
18. Bjorness TE, Booth V, Poe GR. Hippocampal theta power pressure builds over non-REM sleep and dissipates within REM sleep episodes. *Arch Ital Biol* 156: 112–126, 2018. doi: 10.12871/00039829201833.
19. BLISS T. V. P LT. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232: 357–374, 1973. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010274.
20. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31–39, 1993. doi: 10.1038/361031a0.
21. Borbély AA. Human Neurobiology A Two Process Model of Sleep Regulation [Online]. *Hum Neurobiol* 1: 195–204, 1982. [https://www.academia.edu/download/32314612/Borbely\\_AA\\_\(1982\)\\_Human\\_Neurobiology\\_1\\_\\_195-204.pdf](https://www.academia.edu/download/32314612/Borbely_AA_(1982)_Human_Neurobiology_1__195-204.pdf).
22. Born J. Slow-wave sleep and the consolidation of long-term memory. *World J. Biol. Psychiatry* 11: 16–21, 2010.
23. Born J, Wilhelm I. System consolidation of memory during sleep. *Psychol Res* 76: 192–203, 2012. doi: 10.1007/s00426-011-0335-6.
24. Bowyer SM. Coherence a measure of the brain networks: past and present. *Neuropsychiatr Electrophysiol* 2: 1–12, 2016. doi: 10.1186/s40810-015-0015-7.
25. Boyce R, Glasgow SD, Williams S. Boyce2016. 23, 2016.

26. Boyce R, Glasgow SD, Williams S, Adamantidis A. Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science* 352: 812–816, 2016. doi: 10.1126/science.aad5252.
27. Brown TH, Chapman PF, Kairiss EW, Keenan CL. Long-term synaptic potentiation. *Science* (80- ) 242: 724–728, 1988. doi: 10.1126/science.2903551.
28. Brunner DP, Dijk DJ, Borbely AA. Repeated partial sleep deprivation progressively changes the EEG during sleep and wakefulness. *Sleep* 16: 100–113, 1993. doi: 10.1093/sleep/16.2.100.
29. Buzsáki G. Two-stage model of memory trace formation: A role for “noisy” brain states. *Neuroscience* 31: 551–570, 1989.
30. Buzsáki G. Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* 25: 1073–1188, 2015. doi: 10.1002/hipo.22488.
31. Buzsáki G. Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* 33: 325–340, 2002. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00586-X.
32. Buzsáki G. Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* 25: 1073–1188, 2015. doi: 10.1002/hipo.22488.
33. Buzsáki G, Horváth Z, Urioste R, Hetke J, Wise K. High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* (80- ) 256: 1025–1027, 1992. doi: 10.1126/science.1589772.
34. Buzsáki G, Moser EI. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci* 16: 130–138, 2013. doi: 10.1038/nn.3304.
35. Buzsáki G, Wang X-J. Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci* 35: 203–225, 2012. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150444.
36. Canolty RT, Cadieu CF, Koepsell K, Knight RT, Carmena JM. Multivariate phase-amplitude cross-frequency coupling in neurophysiological signals. *IEEE Trans Biomed Eng* 59: 8–11, 2012. doi: 10.1109/TBME.2011.2172439.
37. Canolty RT, Knight RT. The functional role of cross-frequency coupling. *Trends Cogn Sci* 14: 506–515, 2010. doi: 10.1016/j.tics.2010.09.001.

38. Cirelli C, Tononi G. The why and how of sleep-dependent synaptic down-selection. *Semin Cell Dev Biol* 125: 91–100, 2021. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.02.007.
39. Cirelli C, Tononi G. Sleep and synaptic homeostasis. *Sleep* 38 Associated Professional Sleep Societies,LLC: 161–162, 2015.
40. Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 33: 18–41, 2008. doi: 10.1038/sj.npp.1301559.
41. Colgin LL. Rhythms of the hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* 17: 239–249, 2016.
42. Czarnecki A, Birtoli B, Ulrich D. Cellular mechanisms of burst firing-mediated long-term depression in rat neocortical pyramidal cells. *J Physiol* 578: 471–479, 2007. doi: 10.1113/jphysiol.2006.123588.
43. Datta S. Avoidance task training potentiates phasic pontine-wave density in the rat: A mechanism for sleep-dependent plasticity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 20: 8607–8613, 2000. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-22-08607.2000.
44. Di Marco T, Scammell TE, Meinel M, Seboek Kinter D, Datta AN, Zammit G, Dauvilliers Y. Number, Duration, and Distribution of Wake Bouts in Patients with Insomnia Disorder: Effect of Daridorexant and Zolpidem. *CNS Drugs* 37: 639–653, 2023. doi: 10.1007/s40263-023-01020-9.
45. Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11: 114–126, 2010. doi: 10.1038/nrn2762.
46. Djonlagic I, Saboisky J, Carusona A, Stickgold R, Malhotra A. Increased Sleep Fragmentation Leads to Impaired Off-Line Consolidation of Motor Memories in Humans [Online]. *PLoS One* 7: e34106, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034106>.
47. Drieu C, Zugaro M. Hippocampal sequences during exploration: Mechanisms and functions. *Front Cell Neurosci* 13: 1–22, 2019. doi: 10.3389/fncel.2019.00232.

48. Dudai Y. THE NEUROBIOLOGY OF CONSOLIDATIONS, OR, HOW STABLE IS THE ENGRAM. *Annu Rev Psychol* : 51–86, 2004. doi: 10.1146/annurev.psych.55.090902.142050.
49. Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci* 89: 4363–4367, 1992.
50. Engel J, Bragin A, Staba R, Mody I. High-frequency oscillations: What is normal and what is not? *Epilepsia* 50: 598–604, 2009. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01917.x.
51. Eschenko O, Ramadan W, Mölle M, Born J, Sara SJ. Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learn Mem* 15: 222–228, 2008. doi: 10.1101/lm.726008.
52. Esteves IM, Chang H, Neumann AR, McNaughton BL. Consolidation of cellular memory representations in superficial neocortex. *iScience* 26, 2023. doi: 10.1016/j.isci.2023.105970.
53. Esteves IM, Chang H, Neumann AR, Sun J, Mohajerani MH, McNaughton BL. Spatial Information Encoding across Multiple Neocortical Regions Depends on an Intact Hippocampus. *J Neurosci* 41: 307–319, 2021. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1788-20.2020.
54. Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron* 76: 1057–1070, 2012. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.002.
55. Fernández-Ruiz A, Oliva A, de Oliveira EF, Rocha-Almeida F, Tingley D, Buzsáki G. Long-duration hippocampal sharp wave ripples improve memory. *Science* (80- ) 364: 1082–1086, 2019. doi: 10.1126/science.aax0758.
56. Fogel SM, Smith CT. The function of the sleep spindle: A physiological index of intelligence and a mechanism for sleep-dependent memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 1154–1165, 2011. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.12.003.

57. Fogel SM, Smith CT. Learning-dependent changes in sleep spindles and Stage 2 sleep. *J Sleep Res* 15: 250–255, 2006. doi: 10.1111/j.1365-2869.2006.00522.x.
58. Fogel SM, Smith CT, Cote KA. Dissociable learning-dependent changes in REM and non-REM sleep in declarative and procedural memory systems. *Behav Brain Res* 180: 48–61, 2007. doi: 10.1016/j.bbr.2007.02.037.
59. Franken P, Malafosse A, Tafti M. Genetic determinants of sleep regulation in inbred mice. *Sleep* 22: 155–169, 1999. doi: 10.1093/sleep/22.2.155.
60. Franz SI, Lashley KS. The retention of habits by the rat after destruction of the frontal portion of the cerebrum. *Psychobiology* 1: 3–18, 1917. doi: 10.1037/h0074177.
61. Furtunato AMB, Lobão-Soares B, Tort ABL, Belchior H. Specific Increase of Hippocampal Delta Oscillations Across Consecutive Treadmill Runs. *Front Behav Neurosci* 14: 1–13, 2020. doi: 10.3389/fnbeh.2020.00101.
62. Gais S, Mölle M, Helms K, Born J. Learning-dependent increases in sleep spindle density. *J Neurosci* 22: 6830–6834, 2002. doi: 10.1523/jneurosci.22-15-06830.2002.
63. Ge C, Chen W, Zhang L, Ai Y, Zou Y, Peng Q. Chemogenetic activation of the HPC-mPFC pathway improves cognitive dysfunction in lipopolysaccharide -induced brain injury. *Theranostics* 13: 2946–2961, 2023. doi: 10.7150/thno.82889.
64. Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci* 12: 1222–1223, 2009. doi: 10.1038/nn.2384.
65. Girardeau G, Cei A, Zugaro M. Learning-induced plasticity regulates hippocampal sharp wave-ripple drive. *J Neurosci* 34: 5176–5183, 2014. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4288-13.2014.
66. Girardeau G, Lopes-Dos-Santos V. Brain neural patterns and the memory function of sleep. *Science (80- )* 374: 560–564, 2021. doi: 10.1126/SCIENCE.ABI8370.
67. Girardeau G, Lopes-Dos-Santos V. Brain neural patterns and the memory function of sleep. *Science* 374: 560–564, 2021. doi: 10.1126/science.abi8370.

68. Giri B, Kaya U, Abel T, Diba K. Sleep loss diminishes hippocampal reactivation and replay [Online]. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2540186/v1>.
69. Glenberg AM. What memory is for. *Behav Brain Sci* 20: 1–19, 1997. doi: DOI: 10.1017/S0140525X97000010.
70. González-Rueda A, Pedrosa V, Feord RC, Clopath C, Paulsen O. Activity-Dependent Downscaling of Subthreshold Synaptic Inputs during Slow-Wave-Sleep-like Activity In Vivo. *Neuron* 97: 1244-1252.e5, 2018. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.047.
71. Guyon N, Zacharias LR, Fermino de Oliveira E, Kim H, Leite JP, Lopes-Aguiar C, Carlén M. Network Asynchrony Underlying Increased Broadband Gamma Power. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 41: 2944–2963, 2021. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2250-20.2021.
72. Hashmi A, Nere A, Tononi G. Sleep-dependent synaptic down-selection (II): Single-neuron level benefits for matching, selectivity, and specificity. *Front Neurol* 4 OCT: 1–16, 2013. doi: 10.3389/fneur.2013.00148.
73. Hayes MH. *Statistical Digital Signal Processing and Modeling* [Online]. Wiley India Pvt. Limited. <https://books.google.com.br/books?id=z0GqhOe9GNQC>.
74. Hebb DO. *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. Oxford, England: Wiley, 1949.
75. Hellman K, Abel T. Fear Conditioning Increases NREM Sleep. *Behav Neurosci* 121: 310–323, 2007. doi: 10.1037/0735-7044.121.2.310.
76. Holschneider DP, Givrad TK, Yang J, Stewart SB, Francis SR, Wang Z, Maarek JMI. Cerebral perfusion mapping during retrieval of spatial memory in rats. *Behav Brain Res* 375: 112116, 2019. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112116.
77. Honda M, Ito W, Ueno T, Wada M, Narisawa H, Kato N. 0632 Analysis of Sleep Bout Duration: A New Marker to Differentiate Narcolepsy Type 1. *Sleep* 41: A235–A235, 2018. doi: 10.1093/sleep/zsy061.631.



78. Huber R, Born J. Sleep, synaptic connectivity, and hippocampal memory during early development. *Trends Cogn Sci* 18: 141–152, 2014. doi: 10.1016/j.tics.2013.12.005.
79. Huber R, Ghilardi MF, Massimini M, Tononi G. Local sleep and learning. *Nature* 430: 78–81, 2004. doi: 10.1038/nature02663.
80. Hutchison IC, Rathore S. The role of REM sleep theta activity in emotional memory. *Front Psychol* 6: 1–15, 2015. doi: 10.3389/fpsyg.2015.01439.
81. Ito M, Kano M. Long-lasting depression of parallel fiber-Purkinje cell transmission induced by conjunctive stimulation of parallel fibers and climbing fibers in the cerebellar cortex. *Neurosci Lett* 33: 253–258, 1982.
82. Jay TM, Glowinski J, Thierry A-M. Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* 505: 337–340, 1989.
83. Jay TM, Witter MP. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313: 574–586, 1991.
84. Jegou A, Schabus M, Gosseries O, Dahmen B, Albouy G, Desseilles M, Sterpenich V, Phillips C, Maquet P, Grova C, Dang-Vu TT. Cortical reactivations during sleep spindles following declarative learning. *Neuroimage* 195: 104–112, 2019. doi: 10.1016/j.neuroimage.2019.03.051.
85. Jones MW, Wilson MA. Theta Rhythms Coordinate Hippocampal–Prefrontal Interactions in a Spatial Memory Task [Online]. *PLOS Biol* 3: e402, 2005. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030402>.
86. Josselyn SA, Köhler S, Frankland PW. Finding the engram. *Nat Rev Neurosci* 16: 521–534, 2015. doi: 10.1038/nrn4000.
87. Kahana MJ, Sekuler R, Caplan JB, Kirschen M, Madsen JR. Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze navigation. *Nature* 399: 781–784, 1999. doi: 10.1038/21645.
88. Karlsson MP, Frank LM. Awake replay of remote experiences in the hippocampus. *Nat Neurosci* 12: 913–918, 2009. doi: 10.1038/nn.2344.

89. Kim J, Gulati T, Ganguly K. Competing Roles of Slow Oscillations and Delta Waves in Memory Consolidation versus Forgetting. *Cell* 179: 514-526.e13, 2019. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.040.
90. KLIMESCH W, DOPPELMAYR M, SCHIMKE H, RIPPER B. Theta synchronization and alpha desynchronization in a memory task. *Psychophysiology* 34: 169–176, 1997. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.1997.tb02128.x>.
91. Klinzing JG, Niethard N, Born J. Mechanisms of systems memory consolidation during sleep. *Nat Neurosci* 22: 1598–1610, 2019. doi: 10.1038/s41593-019-0467-3.
92. Klinzing JG, Niethard N, Born J. Mechanisms of systems memory consolidation during sleep. *Nat. Neurosci.* 22 Nature Publishing Group: 1598–1610, 2019.
93. Lachaux J, Rodriguez E, Martinerie J, Varela FJ. Measuring phase synchrony in brain signals. *Hum Brain Mapp* 8: 194–208, 1999.
94. Landeck L, Kaiser ME, Hefter D, Draguhn A, Both M. Enriched Environment Modulates Sharp Wave-Ripple (SPW-R) Activity in Hippocampal Slices. *Front Neural Circuits* 15: 1–12, 2021. doi: 10.3389/fncir.2021.758939.
95. Lashley KS. Integrative functions of the cerebral cortex. *Physiol Rev* 13: 1–42, 1933.
96. Lashley KS. *Studies of Cerebral Function in Learning: XI. The Behavior of the Rat in Latch Box Situations. The Mechanism of Vision. XII. Nervous Structures Concerned in the Acquisition and Retention of Habits Based on Reactions to Light.* Johns Hopkins Press, 1935.
97. Lee H, Simpson G V, Logothetis NK, Rainer G. Phase Locking of Single Neuron Activity to Theta Oscillations during Working Memory in Monkey Extrastriate Visual Cortex. *Neuron* 45: 147–156, 2005. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.025.
98. Liu ZW, Faraguna U, Cirelli C, Tononi G, Gao XB. Direct evidence for wake-related increases and sleep-related decreases in synaptic strength in rodent cortex. *J Neurosci* 30: 8671–8675, 2010. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1409-10.2010.
99. Ile MM, Born J. Hippocampus Whispering in Deep Sleep to Prefrontal Cortex-For Good Memories? *Mol Cell Neurosci* 170: 661–672, 2005. doi: 10.1016/j.mcn.

100. Lobato IN, Aleman-Zapata A, Samanta A, Bogers M, Narayanan S, Rayan A, Alonso A, van der Meij J, Khamassi M, Khan ZU, Genzel L. Increased cortical plasticity leads to memory interference and enhanced hippocampal-cortical interactions. *Elife* 12: 1–28, 2023. doi: 10.7554/eLife.84911.
101. Louie K, Wilson MA. Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron* 29: 145–156, 2001. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00186-6.
102. Lubenov E V, Siapas AG. Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature* 459: 534–539, 2009. doi: 10.1038/nature08010.
103. Lubenov E V, Siapas AG. Decoupling through synchrony in neuronal circuits with propagation delays. *Neuron* 58: 118–131, 2008. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.036.
104. Lustenberger C, Boyle MR, Alagapan S, Mellin JM, Vaughn BV, Fröhlich F. Feedback-Controlled Transcranial Alternating Current Stimulation Reveals a Functional Role of Sleep Spindles in Motor Memory Consolidation. *Curr Biol* 26: 2127–2136, 2016. doi: 10.1016/j.cub.2016.06.044.
105. Maier N, Nimmrich V, Draguhn A. Cellular and network mechanisms underlying spontaneous sharp wave-ripple complexes in mouse hippocampal slices. *J Physiol* 550: 873–887, 2003. doi: 10.1113/jphysiol.2003.044602.
106. Maingret N, Girardeau G, Todorova R, Goutierre M, Zugaro M. Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nat Neurosci* 19: 959–964, 2016. doi: 10.1038/nn.4304.
107. Malekpour S, Gubner JA, Sethares WA. Measures of generalized magnitude-squared coherence: Differences and similarities. *J Franklin Inst* 355: 2932–2950, 2018. doi: 10.1016/j.jfranklin.2018.01.014.
108. Malekpour S, li Z, Cheung BLP, Castillo EM, Papanicolaou AC, Kramer LA, Fletcher JM, Van Veen BD. Interhemispheric Effective and Functional Cortical Connectivity Signatures of Spina Bifida Are Consistent with Callosal Anomaly. *Brain Connect* 2: 142–154, 2012. doi: 10.1089/brain.2011.0058.

109. Markram H, Tsodyks M. Redistribution of synaptic efficacy between neocortical pyramidal neurons. *Nature* 382: 807–810, 1996.
110. Marshall L, Born J. The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends Cogn. Sci.* 11: 442–450, 2007.
111. Marshall L, Born J. The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends Cogn. Sci.* 11: 442–450, 2007.
112. Marshall L, Helgadóttir H, Mölle M, Born J. Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature* 444: 610–613, 2006. doi: 10.1038/nature05278.
113. Mathis A, Mamidanna P, Cury KM, Abe T, Murthy VN, Mathis MW, Bethge M. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat Neurosci* 21: 1281–1289, 2018. doi: 10.1038/s41593-018-0209-y.
114. Maurer U, Brem S, Liechti M, Maurizio S, Michels L, Brandeis D. Frontal Midline Theta Reflects Individual Task Performance in a Working Memory Task. *Brain Topogr* 28: 127–134, 2015. doi: 10.1007/s10548-014-0361-y.
115. McClelland JL. Emergence in Cognitive Science. *Top Cogn Sci* 2: 751–770, 2010. doi: 10.1111/j.1756-8765.2010.01116.x.
116. McNaughton MAW and BL. Reactivation of Hippocampal Ensemble Memories During Sleep. *Science* (80- ) 265: 676–679, 1994.
117. Meier K, Merseburg A, Isbrandt D, Lawrence Marguet S, Morellini F. Dentate gyrus sharp waves, a local field potential correlate of learning in the dentate gyrus of mice. *J Neurosci* 40: 7105–7118, 2020. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2275-19.2020.
118. Mendelson WB, Bergmann BM. EEG delta power during sleep in young and old rats. *Neurobiol Aging* 20: 669–673, 1999. doi: 10.1016/S0197-4580(99)00062-7.
119. Miyamoto D, Hirai D, Fung CCA, Inutsuka A, Odagawa M, Suzuki T, Boehringer R, Adaikkan C, Matsubara C, Matsuki N, Fukai T, McHugh TJ, Yamanaka A, Murayama M. Top-down cortical input during NREM sleep consolidates perceptual memory. *Science* (80- ) 352: 1315–1318, 2016. doi: 10.1126/science.aaf0902.

120. Miyamoto D, Hirai D, Murayama M. The roles of cortical slow waves in synaptic plasticity and memory consolidation. *Front Neural Circuits* 11: 1–8, 2017. doi: 10.3389/fncir.2017.00092.
121. Miyamoto D, Murayama M. The fiber-optic imaging and manipulation of neural activity during animal behavior. *Neurosci Res* 103: 1–9, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.09.004>.
122. Miyamoto H, Katagiri H, Hensch T. Experience-dependent slow-wave sleep development. *Nat Neurosci* 6: 553–554, 2003. doi: 10.1038/nn1064.
123. Mölle M, Yeshenko O, Marshall L, Sara SJ, Born J. Hippocampal sharp wave-ripples linked to slow oscillations in rat slow-wave sleep. *J Neurophysiol* 96: 62–70, 2006. doi: 10.1152/jn.00014.2006.
124. Morin A, Doyon J, Dostie V, Barakat M, Tahar AH, Korman M, Benali H, Karni A, Ungerleider LG, Carrier J. Motor sequence learning increases sleep spindles and fast frequencies in post-training sleep. *Sleep* 31: 1149–1156, 2008. doi: 10.5665/sleep/31.8.1149.
125. Moroni F, Nobili L, Iaria G, Sartori I, Marzano C, Tempesta D, Proserpio P, Lo Russo G, Gozzo F, Cipolli C, De Gennaro L, Ferrara M. Hippocampal slow EEG frequencies during NREM sleep are involved in spatial memory consolidation in humans. *Hippocampus* 24: 1157–1168, 2014. doi: 10.1002/hipo.22299.
126. Negrón-Oyarzo I, Espinosa N, Aguilar M, Fuenzalida M, Aboitiz F, Fuentealba P. Coordinated prefrontal–hippocampal activity and navigation strategy-related prefrontal firing during spatial memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 7123–7128, 2018. doi: 10.1073/pnas.1720117115.
127. Ngo HV V., Born J. Sleep and the Balance between Memory and Forgetting. *Cell* 179: 289–291, 2019. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.007.
128. Ngo H-VV, Martinetz T, Born J, Mölle M. Auditory Closed-Loop Stimulation of the Sleep Slow Oscillation Enhances Memory. *Neuron* 78: 545–553, 2013. doi: 10.1016/j.neuron.2013.03.006.

129. Nigbur R, Ivanova G, Stürmer B. Theta power as a marker for cognitive interference. *Clin Neurophysiol* 122: 2185–2194, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2011.03.030>.
130. Nitzan N, Swanson R, Schmitz D, Buzsáki G. Brain-wide interactions during hippocampal sharp wave ripples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, 2022. doi: [10.1073/pnas.2200931119](https://doi.org/10.1073/pnas.2200931119).
131. Norimoto H, Makino K, Gao M, Shikano Y, Okamoto K, Ishikawa T, Sasaki T, Hioki H, Fujisawa S, Ikegaya Y. Hippocampal ripples down-regulate synapses. *Science* (80- ) 359: 1524–1527, 2018. doi: [10.1126/science.aao0702](https://doi.org/10.1126/science.aao0702).
132. Nutt DJ, Wilson S, Paterson L. Sleep disorders as core symptoms of depression. *Dialogues Clin Neurosci* 10: 329–336, 2008. doi: [10.31887/dcns.2008.10.3/dnutt](https://doi.org/10.31887/dcns.2008.10.3/dnutt).
133. O'Keefe J, Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. 1979.
134. Olcese U, Esser SK, Tononi G. Sleep and synaptic renormalization: A computational study. *J Neurophysiol* 104: 3476–3493, 2010. doi: [10.1152/jn.00593.2010](https://doi.org/10.1152/jn.00593.2010).
135. O'Neill J, Pleydell-Bouverie B, Dupret D, Csicsvari J. Play it again: reactivation of waking experience and memory. *Trends Neurosci* 33: 220–229, 2010. doi: [10.1016/j.tins.2010.01.006](https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.01.006).
136. O'Neill P-K, Gordon JA, Sigurdsson T. Theta oscillations in the medial prefrontal cortex are modulated by spatial working memory and synchronize with the hippocampus through its ventral subregion. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33: 14211–14224, 2013. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2378-13.2013](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2378-13.2013).
137. Park SH, Weber F. Neural and Homeostatic Regulation of REM Sleep. *Front Psychol* 11, 2020. doi: [10.3389/fpsyg.2020.01662](https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.01662).
138. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* [Online]. Academic Press. <https://books.google.com.br/books?id=2hp5QgAACAAJ>.
139. Peters KR, Ray L, Smith V, Smith C. Changes in the density of stage 2 sleep spindles following motor learning in young and older adults. *J Sleep Res* 17: 23–33, 2008. doi: [10.1111/j.1365-2869.2008.00634.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2008.00634.x).

140. Peyrache A, Battaglia FP, Destexhe A. Inhibition recruitment in prefrontal cortex during sleep spindles and gating of hippocampal inputs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 17207–17212, 2011. doi: 10.1073/pnas.1103612108.
141. Peyrache A, Khamassi M, Benchenane K, Wiener SI, Battaglia FP. Replay of rule-learning related neural patterns in the prefrontal cortex during sleep. *Nat Neurosci* 12: 919–926, 2009. doi: 10.1038/nn.2337.
142. Peyrache A, Seibt J. A mechanism for learning with sleep spindles. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 375: 22–24, 2020. doi: 10.1098/rstb.2019.0230.
143. Pitts MW. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *Bio-protocol* 8, 2018. doi: 10.21769/bioprotoc.2744.
144. Poe GR, Nitz DA, McNaughton BL, Barnes CA. Experience-dependent phase-reversal of hippocampal neuron firing during REM sleep. *Brain Res* 855: 176–180, 2000. doi: 10.1016/S0006-8993(99)02310-0.
145. Popa D, Duvarci S, Popescu AT, Léna C, Paré D. Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 6516–6519, 2010. doi: 10.1073/pnas.0913016107.
146. Postle BR. Working memory as an emergent property of the mind and brain. *Neuroscience* 139: 23–38, 2006. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.005.
147. Radiske A, Gonzalez MC, Conde-Ocazonez S, Rossato JI, Köhler CA, Cammarota M. Cross-frequency phase-amplitude coupling between hippocampal theta and gamma oscillations during recall destabilizes memory and renders it susceptible to reconsolidation disruption. *J Neurosci* 40: 6398–6408, 2020. doi: 10.1523/JNEUROSCI.025920.2020.
148. Radiske A, Gonzalez MC, Conde-Ocazonez S, Rossato JI, Köhler CA, Cammarota M. Cross-Frequency Phase-Amplitude Coupling between Hippocampal Theta and Gamma Oscillations during Recall Destabilizes Memory and Renders It Susceptible to Reconsolidation Disruption. *J Neurosci* 40: 6398 LP – 6408, 2020. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0259-20.2020.

149. Raghavachari S, Kahana MJ, Rizzuto DS, Caplan JB, Kirschen MP, Bourgeois B, Madsen JR, Lisman JE. Gating of Human Theta Oscillations by a Working Memory Task. *J Neurosci* 21: 3175 LP – 3183, 2001. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-09-03175.2001.
150. Ramadan W, Eschenko O, Sara SJ. Hippocampal sharp wave/ripples during sleep for consolidation of associative memory. *PLoS One* 4, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0006697.
151. Rasch B, Born J. About sleep's role in memory. *Physiol Rev* 93: 681–766, 2013. doi: 10.1152/physrev.00032.2012.
152. Reed DL, Sacco WP. Measuring Sleep Efficiency: What Should the Denominator Be? *J Clin sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med* 12: 263–266, 2016. doi: 10.5664/jcsm.5498.
153. Rego DG. Estudo das relações entre idade, parâmetros cognitivos espaciais e atividade do sistema serotoninérgico no hipocampo de ratos. .
154. Reynolds D. Gaussian Mixture Models. *Encycl Biometrics* : 827–832, 2009. doi: 10.1007/978-1-4899-7488-4\_196.
155. Ribeiro S, Goyal V, Mello C V., Pavlides C. Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learn Mem* 6: 500–508, 1999. doi: 10.1101/lm.6.5.500.
156. Ribeiro S, Mello C V., Velho T, Gardner TJ, Jarvis ED, Pavlides C. Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. *J Neurosci* 22: 10914–10923, 2002. doi: 10.1523/jneurosci.22-24-10914.2002.
157. Rioult-Pedotti MS, Friedman D, Donoghue JP. Learning-induced LTP in neocortex. *Science (80- )* 290: 533–536, 2000. doi: 10.1126/science.290.5491.533.
158. Rolls A, Colas D, Adamantidis A, Carter M, Lanre-Amos T, Heller HC, De Lecea L. Optogenetic disruption of sleep continuity impairs memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13305–13310, 2011. doi: 10.1073/pnas.1015633108.



159. Roman F, Staubli U, Lynch G. Evidence for synaptic potentiation in a cortical network during learning. *Brain Res* 418: 221–226, 1987. doi: 10.1016/0006-8993(87)90089-8.
160. Roy DS, Park YG, Kim ME, Zhang Y, Ogawa SK, DiNapoli N, Gu X, Cho JH, Choi H, Kamentsky L, Martin J, Mosto O, Aida T, Chung K, Tonegawa S. Brain-wide mapping reveals that engrams for a single memory are distributed across multiple brain regions. *Nat Commun* 13, 2022. doi: 10.1038/s41467-022-29384-4.
161. Sadowski JHLP, Jones MW, Mellor JR. Sharp-Wave Ripples Orchestrate the Induction of Synaptic Plasticity during Reactivation of Place Cell Firing Patterns in the Hippocampus. *Cell Rep* 14: 1916–1929, 2016. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.061.
162. Scheffzük C, Kukushka VI, Vyssotski AL, Draguhn A, Tort ABL, Brankač J. Selective Coupling between Theta Phase and Neocortical Fast Gamma Oscillations during REM-Sleep in Mice [Online]. *PLoS One* 6: e28489, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028489>.
163. Schlingloff D, Káli S, Freund TF, Hájos N, Gulyás AI. Mechanisms of sharp wave initiation and ripple generation. *J Neurosci* 34: 11385–11398, 2014. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0867-14.2014.
164. Schmidt B, Redish AD. Disrupting the medial prefrontal cortex with designer receptors exclusively activated by designer drug alters hippocampal sharp-wave ripples and their associated cognitive processes. *Hippocampus* 31: 1051–1067, 2021. doi: 10.1002/hipo.23367.
165. SCOVILLE W. B MB. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87: 230, 1957. doi: 10.1136/jnnp-2015-311092.
166. Semon R. *The Mneme* London. Allen & Unwin.(Original work published 1904): 1921.
167. Semon RW. *Mnemic psychology*. London: Allen. Unwin: 1923.
168. Siddoway B, Hou H, Xia H. Molecular mechanisms of homeostatic synaptic downscaling. *Neuropharmacology* 78: 38–44, 2014. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.07.009.

169. Siegle JH, López AC, Patel YA, Abramov K, Ohayon S, Voigts J. Open Ephys: an open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology. *J Neural Eng* 14: 45003, 2017. doi: 10.1088/1741-2552/aa5eea.
170. Sigurdsson T, Stark KL, Karayiorgou M, Gogos JA, Gordon JA. Impaired hippocampal-prefrontal synchrony in a genetic mouse model of schizophrenia. *Nature* 464: 763–767, 2010. doi: 10.1038/nature08855.
171. Smith C. Sleep states, memory processes and synaptic plasticity. *Behav Brain Res* 78: 49–56, 1996. doi: 10.1016/0166-4328(95)00218-9.
172. Smith CT, Nixon MR, Nader RS. Posttraining increases in REM sleep intensity implicate REM sleep in memory processing and provide a biological marker of learning potential. *Learn Mem* 11: 714–719, 2004. doi: 10.1101/lm.74904.
173. Smith CT, Nixon MR, Nader RS. Posttraining increases in REM sleep intensity implicate REM sleep in memory processing and provide a biological marker of learning potential. *Learn Mem* 11: 714–719, 2004. doi: 10.1101/lm.74904.
174. Sorscher AJ. How is your sleep: A neglected topic for health care screening. *J Am Board Fam Med* 21: 141–148, 2008. doi: 10.3122/jabfm.2008.02.070167.
175. Steriade M, Nuñez A, Neurophysiologie L De, Mbdecine F De, Laval U, Glk C. A Novel Slow ( < 1 Hz ) Oscillation of Neocortical Neurons in vivo: Depolarizing and Hyperpolarizing Components. *J Neurosci* 73: 3252–3265, 1993.
176. Suzuki SS, Smith GK. Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus II. Relations to synchronous burst discharges. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 69: 532–540, 1988. doi: 10.1016/0013-4694(88)90165-4.
177. Tamaki M, Matsuoka T, Nittono H, Hori T. Activation of fast sleep spindles at the premotor cortex and parietal areas contributes to motor learning: A study using sLORETA. *Clin Neurophysiol* 120: 878–886, 2009. doi: 10.1016/j.clinph.2009.03.006.
178. Tamminen J, Payne JD, Stickgold R, Wamsley EJ, Gaskell MG. Sleep spindle activity is associated with the integration of new memories and existing knowledge. *J Neurosci* 30: 14356–14360, 2010. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3028-10.2010.

179. Tang W, Jadhav SP. Sharp-wave ripples as a signature of hippocampal-prefrontal reactivation for memory during sleep and waking states. *Neurobiol Learn Mem* 160: 11–20, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.01.002>.
180. Tang W, Shin JD, Frank LM, Jadhav SP. Hippocampal-prefrontal reactivation during learning is stronger in awake compared with sleep states. *J Neurosci* 37: 11789–11805, 2017. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2291-17.2017](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2291-17.2017).
181. Tavares LCS, Tort ABL. Hippocampal–prefrontal interactions during spatial decision-making. *Hippocampus* 32: 38–54, 2022. doi: <https://doi.org/10.1002/hipo.23394>.
182. Todorova R, Zugaro M. Isolated cortical computations during delta waves support memory consolidation. *Science* (80- ) 366: 377–381, 2019. doi: [10.1126/science.aay0616](https://doi.org/10.1126/science.aay0616).
183. Tonegawa S, Morrissey MD, Kitamura T. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat Rev Neurosci* 19: 485–498, 2018. doi: [10.1038/s41583-018-0031-2](https://doi.org/10.1038/s41583-018-0031-2).
184. Tononi G, Cirelli C. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Med Rev* 10: 49–62, 2006. doi: [10.1016/j.smrv.2005.05.002](https://doi.org/10.1016/j.smrv.2005.05.002).
185. Tononi G, Cirelli C. Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. *Neuron* 81: 12–34, 2014. doi: [10.1016/j.neuron.2013.12.025](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.025).
186. Tononi G, Cirelli C. Sleep and synaptic homeostasis: A hypothesis. *Brain Res Bull* 62: 143–150, 2003. doi: [10.1016/j.brainresbull.2003.09.004](https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2003.09.004).
187. Tononi G, Cirelli C. Time to be SHY? Some comments on sleep and synaptic homeostasis. *Neural Plast*. 2012 Hindawi Publishing Corporation: 2012.
188. Tononi G, Cirelli C. Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. *Neuron* 81: 12–34, 2014.
189. Tort ABL, Komorowski RW, Manns JR, Kopell NJ, Eichenbaum H. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20942–20947, 2009. doi: [10.1073/pnas.0911331106](https://doi.org/10.1073/pnas.0911331106).

190. Tort ABL, Kramer MA, Thorn C, Gibson DJ, Kubota Y, Graybiel AM, Kopell NJ. Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20517–20522, 2008. doi: 10.1073/pnas.0810524105.
191. Vanderwolf CH. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 26: 407–418, 1969. doi: [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(69\)90092-3](https://doi.org/10.1016/0013-4694(69)90092-3).
192. Vivekananda U, Bush D, Bisby JA, Baxendale S, Rodionov R, Diehl B, Chowdhury FA, McEvoy AW, Miserocchi A, Walker MC, Burgess N. Theta power and theta-gamma coupling support long-term spatial memory retrieval. *Hippocampus* 31: 213–220, 2021. doi: <https://doi.org/10.1002/hipo.23284>.
193. Vyazovskiy V V., Cirelli C, Pfister-Genskow M, Faraguna U, Tononi G. Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nat Neurosci* 11: 200–208, 2008. doi: 10.1038/nn2035.
194. Wahlstrom KL, Huff ML, Emmons EB, Freeman JH, Narayanan NS, McIntyre CK, Lalumiere RT. Basolateral amygdala inputs to the medial entorhinal cortex selectively modulate the consolidation of spatial and contextual learning. *J Neurosci* 38: 2698–2712, 2018. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2848-17.2018.
195. Wang D V., Ikemoto S. Coordinated interaction between hippocampal sharp-wave ripples and anterior cingulate unit activity. *J Neurosci* 36: 10663–10672, 2016. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1042-16.2016.
196. Wei Y, Krishnan GP, Bazhenov M. Synaptic mechanisms of memory consolidation during sleep slow oscillations. *J Neurosci* 36: 4231–4247, 2016. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3648-15.2016.
197. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* (80- ) 313: 1093–1097, 2006. doi: 10.1126/science.1128134.
198. Wisor JP, Pasumarthi RK, Gerashchenko D, Thompson CL, Pathak S, Sancar A, Franken P, Lein ES, Kilduff TS. Sleep deprivation effects on circadian clock gene expression in the cerebral cortex parallel electroencephalographic differences among

mouse strains. *J Neurosci* 28: 7193–7201, 2008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1150-08.2008.

199. Xu P, Chen A, Li Y, Xing X, Lu H. Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiol Genomics* 51: 432–442, 2019. doi: 10.1152/physiolgenomics.00006.2019.

200. Yamada M, Sakurai Y. An observational learning task using Barnes maze in rats. *Cogn Neurodyn* 12: 519–523, 2018. doi: 10.1007/s11571-018-9493-1.

201. Yang W, Sun C, Huszár R, Hainmueller T, Kiselev K, Buzsáki G. Selection of experience for memory by hippocampal sharp wave ripples. *Science* (80- ) 383: 1478–1483, 2024. doi: 10.1126/science.adk8261.

202. Zhou Z, Norimoto H. Sleep sharp wave ripple and its functions in memory and synaptic plasticity. *Neurosci Res* 189: 20–28, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2023.01.011>.