

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

Bruno Monteiro de Sousa

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DAS *SHARP WAVE-RIPPLES*  
DURANTE O SONO EM PROCESSOS DE FORMAÇÃO DE  
MEMÓRIA ESPACIAL**

Belo Horizonte

2024

Bruno Monteiro de Sousa

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DAS *SHARP WAVE-RIPPLES*  
DURANTE O SONO EM PROCESSOS DE FORMAÇÃO DE  
MEMÓRIA ESPACIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar

Co-orientador: Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão

Belo Horizonte

2024

043

Sousa, Bruno Monteiro de.

Investigação do papel das sharp wave-ripples durante o sono em processos de formação de memória espacial [manuscrito] / Bruno Monteiro de Sousa. – 2024.

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

Orientador: Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar. Co-orientador: Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão.

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

1. Fisiologia. 2. Memória. 3. Sono. 4. Hipocampo. 5. Córtex Pré-Frontal. I. Aguiar, Cleiton Lopes. II. Mourão, Flávio Afonso Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 591 DE BRUNO  
MONTEIRO DE SOUSA

# "INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DAS SHARP WAVE-RIPPLES DURANTE O SONO EM PROCESSOS DE FORMAÇÃO DE MEMÓRIA ESPACIAL"

ESTUDANTE: BRUNO MONTEIRO DE SOUSA

ORIENTADOR: PROF. DR. CLEITON LOPES AGUIAR

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **22 de novembro de 2024**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Prof. Dr. Adriano Bretanha Lopes Tort** - Instituto do Cérebro, UFRN

**Prof. Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão, Coorientador**- University of Illinois - UIUC

**Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar - Orientador** - ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

**Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes** - ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

**Prof. Dr. Jerome Paul Armand Laurent Baron** - ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

**Profa. Dra. Janine Inês Rossato** - Centro de Biociências, Departamento de Fisiologia e comportamento, UFRN

Belo Horizonte, 22 de novembro de 2024



Documento assinado eletronicamente por **Grace Schenatto Pereira Moraes, Professora do Magistério Superior**, em 02/12/2024, às 13:48, 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 **Janine Inez Rossato, Usuário Externo**, em 02/12/2024, às 18:19, 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 **Flávio Afonso Gonçalves Mourão, Usuário Externo**, em 02/12/2024, às 18:55, 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 04/12/2024, às 08:46, 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 **Adriano Bretanha Lopes Tort, Usuário Externo**, em 10/12/2024, às 10:55, 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 **Jerome Paul Armand Laurent Baron, Professor do Magistério Superior**, em 11/12/2024, às 17:34, 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 **3761854** e o código CRC **D4FB075B**.

# Agradecimentos

O interesse pela neurofisiologia, que nasceu com as inspiradoras aulas do prof. Márcio Moraes ainda no curso de engenharia, só me trouxe até aqui porque pude contar, logo no início, com a ajuda do Pedro Lopes e do Vinícius “John”. Meus mais sinceros agradecimentos ao Pedrão e ao John pela disponibilidade, que foi tão valiosa naquele momento. Agradeço também aos professores Carmela Braga, Hugo Michel e Rogério Beato pelo apoio fundamental em momentos importantes dessa caminhada. Ao Marcelo Reis, com quem tive uma grande satisfação em trabalhar e que viabilizou uma transição mais tranquila para essa nova etapa.

Agradeço imensamente ao prof. Cleiton Aguiar por me receber em seu grupo de pesquisa e me guiar, durante esses anos todos, nessa jornada de tanto aprendizado. Poder contar com sua confiança e seu apoio foi fundamental. Também pelo exemplo que é de professor e pesquisador empenhado em contribuir para o avanço das neurociências no Brasil.

Aos consagrados compatriotas, velhos companheiros de caminhada, Igor, Ikaro, Mateus, Rafa, Renan e Xicão, que me ajudaram desde o início no entendimento de conceitos e técnicas tão fundamentais para a execução deste projeto. A ajuda de alguns deles continuou a ser de grande importância até as etapas finais deste trabalho. Agradeço ainda pelas prazerosas discussões científicas que tivemos no CTPMágico. E por falar em CTPMágico, é impossível não lembrar de duas grandes referências presentes desde aquela época. Aos queridos Flavitcho e Léo, sou muito grato pela generosidade, disponibilidade e paciência que sempre tiveram conosco.

Aos colegas mais recentes do LANEK, em particular Anna, Beatriz Schweizer, Beatriz Yonara, Clara Gomes, Rafael Bessa, Isabela, Luka, Naty e Victória, agradeço pelo aprendizado diário e pelo companheirismo durante essa caminhada. Reservo um agradecimento especial à Clara Queiroz e à Iasmin Vitoriano, que participaram mais diretamente da execução deste projeto e com quem tive o privilégio de trabalhar. À Iasmin, também agradeço pelo espírito cativante de curiosidade e de encantamento científico que me trouxe ânimo em alguns momentos difíceis.

Agradeço aos amigos Victor e Roberta, também colegas de curso e com quem tive discussões científicas estimulantes, abertas e frutíferas, que sempre terminavam nas mais profundas reflexões filosóficas.

Aos membros do Zugalab, que me receberam tão bem durante o doutorado sanduíche na França. Michaël, Linda, Federica, Théo, Raphaël, Esther, Anna, Sandrine, Marco, Sid, Paulina, Samuel et Narges, je vous remercie pour votre accueil chaleureux et les bons

moments que nous avons partagés. Também agradeço ao Facundo, Túlio e Izabela, conterrâneos que me fizeram sentir em casa. Aos amigos do 5ème, em especial Francesco, Bárbara, Laís, Abdon, Luís, Livia e Carla pelo companheirismo, pelas boas conversas e risadas que compartilhamos ao longo daquele período.

Ao prof. Cleiton, Flávio, Mateus e Naty, agradeço também por terem encontrado um tempo em suas rotinas tão ocupadas para ler este texto e sugerir melhorias e correções. Aos professores Vinicius Ribas, Victor Santos e Grace Schenatto, que generosamente cederam parte de seu tempo e recursos em seus laboratórios para ajudar com a validação dos experimentos preliminares de optogenética.

Agradeço às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, que viabilizaram a execução deste projeto. Também ao Laboratório Institucional de Neurociências Molecular e Comportamental (LANEC-UFMG) e ao Núcleo de Neurociências (NNC-UFMG) pela disponibilização de recursos laboratoriais.

Aos meus amigos Paulo, Fábio e Renan, com quem pude compartilhar alegrias, dúvidas, vitórias e dificuldades durante todo esse trajeto. Também à Juliana, que me deu suporte durante todo esse período.

Agradeço aos meus pais, Joana e Odair, à minha irmã, Paty, e à minha segunda mãe, Marlene, pelo incentivo, carinho e apoio inquestionável desde o início.

Por fim, dedico um agradecimento especial à minha amada Andressa. Foi ela que acompanhou de perto os bastidores de todo esse processo e que sentiu, junto comigo, o peso da distância. Agradeço pelo carinho, pela compreensão, pelo companheirismo e, especialmente neste último ano, pela paciência. Sei que não foi fácil.

# Resumo

O processo de formação de memórias declarativas parece envolver dois estágios. Inicialmente, informações são codificadas no hipocampo e, em seguida, são distribuídas para regiões associativas do córtex, onde são estabilizadas, integradas e se tornam disponíveis para acesso de longo prazo. As *sharp wave-ripples* (SWRs), eventos oscilatórios de alta frequência registrados no hipocampo, parecem facilitar a comunicação de redes hipocampo-corticais, promovendo a consolidação de memórias durante o sono. Diversos trabalhos reportam prejuízo na consolidação quando as SWRs são suprimidas durante o sono pós-aprendizagem. Além disso, estudos sugerem que as SWRs atuam de forma coordenada com outras atividades oscilatórias corticais (i.e. delta e *spindles*). Nesse contexto, é proposta a hipótese de que a perturbação seletiva das atividades neurais que compõem tal diálogo, tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal medial, resulte em prejuízo na consolidação de memórias. Os objetivos deste trabalho foram: 1) desenvolver um módulo de *software* para detecção *online* de SWRs; 2) investigar os efeitos da perturbação de SWRs durante o sono pós-aprendizado na consolidação de memória episódica; 3) avançar no estabelecimento de uma infraestrutura experimental que permita realizar experimentos de perturbação cortical em malha fechada com optogenética. Na Parte I deste trabalho, são apresentados o desenvolvimento e a validação de um módulo de *software* (*plugin*) para a plataforma Open Ephys dedicado à detecção de SWRs em tempo real. O mecanismo de detecção de movimento integrado ao *plugin* foi capaz de concentrar a atuação do sistema de estimulação nos períodos de sono. Na Parte II, ratos Wistar foram submetidos à perturbação de *ripples* durante o sono após o aprendizado no labirinto de Barnes. A memória foi avaliada 24 horas e 12 dias após o fim da etapa de treinamento. Em comparação com o grupo controle, houve redução na busca por saídas e no tempo despendido no quadrante-alvo depois de 12 dias, mas não após 24 horas. Os resultados indicam que apenas a memória remota foi afetada, sugerindo a participação seletiva das SWRs nos mecanismos de consolidação. Na Parte III é apresentada a padronização dos métodos para a realização de experimentos futuros de manipulação cortical após a detecção de SWRs. Para tal, dois animais-piloto foram submetidos à transfecção de uma opsina inibitória (ArchT) e ao implante de fibra óptica para inibição do córtex pré-frontal medial. O implante desenvolvido, ao contrário dos tradicionais, favorece a manipulação optogenética durante longos períodos e em contextos de grande movimentação do animal. As análises de fluorescência confirmam a expressão de ArchT, mas trabalhos futuros de validação da inibição ainda são necessários. Os resultados deste trabalho contribuem para: 1) estabelecer uma infraestrutura experimental que possibilite testar o papel causal de atividades oscilatórias na consolidação da memória; 2) elucidar os processos de consolidação mediados por SWRs.

**Palavras-chave:** memória. sono. *sharp wave-ripple*. hipocampo. córtex pré-frontal.

# Abstract

The process of forming declarative memories seems to involve two stages. Initially, information is transiently encoded in the hippocampus and then distributed to associative regions of the cortex, where it is stabilized, integrated and becomes available for long-term access. Sharp wave-ripples (SWRs), high-frequency oscillatory events recorded in the hippocampus, seem to facilitate the communication of hippocampus-cortical networks, promoting the consolidation of memories during sleep. Several studies have reported impaired consolidation when SWRs are suppressed during post-learning sleep. In addition, other studies suggest that SWRs act in synchrony with other cortical oscillatory activities (i.e. delta and spindles). In this context, we propose the hypothesis that selective disruption of the neural activities that make up such dialog, both in the hippocampus and the prefrontal cortex, results in impaired memory consolidation. The objectives of this work were: 1) to develop a software module for online detection of SWRs; 2) to investigate the effects of SWR disturbance during post-learning sleep on episodic memory consolidation; 3) to advance in the establishment of an experimental infrastructure that allows closed-loop cortical disturbance experiments to be carried out with optogenetics. The Part I of this work presents the development and validation of a software module (plugin) for the Open Ephys platform dedicated to detect SWRs in real time. The motion detection mechanism integrated to the plugin was able to concentrate the stimulation system's functioning in the sleep periods. In Part II, Wistar rats were subjected to ripple disruption during sleep after learning in the Barnes maze. Memory was assessed 24 hours and 12 days after the end of the training stage. Compared to the control group, there was a reduction in the search for holes and in the time spent in the target quadrant after 12 days, but not after 24 hours. The results indicate that only remote memory was affected, suggesting the selective participation of SWRs in the consolidation mechanisms. Part III presents the standardization of methods for carrying out future cortical manipulation experiments following the detection of SWRs. To this end, two animals were transfused with an inhibitory opsin (ArchT) and implanted with an optical fiber for the inhibition of the prefrontal cortex. The developed implant, unlike the traditional ones, favors optogenetic manipulation over long periods and in contexts in which the animal moves more often. Fluorescence analyses confirm ArchT expression, but future work is still needed to validate the inhibition. The results of this work contribute to: 1) establish an experimental infrastructure that makes it possible to test the causal role of oscillatory activities in memory consolidation; 2) elucidate the consolidation processes mediated by SWRs.

**Key-words:** memory. sleep. sharp wave-ripple. hippocampus. prefrontal cortex.

# Lista de ilustrações

Figura 1 – Taxonomia funcional dos sistemas de memória. . . . .	21
Figura 2 – Modelo de formação de memória em dois estágios. . . . .	23
Figura 3 – Conexões relevantes entre hipocampo e mPFC. . . . .	26
Figura 4 – Oscilações de EEG típicas dos estágios de sono REM e NREM. . . . .	27
Figura 5 – A atividade sequencial das <i>place cells</i> durante a exploração espacial é repetida durante o sono subsequente. . . . .	29
Figura 6 – LFP do hipocampo e registro de <i>sharp wave-ripples</i> . . . . .	33
Figura 7 – A indução de delta e <i>spindle</i> no mPFC após SWRs potencializa a consolidação de memória espacial. . . . .	36
Figura 8 – GUI do Open Ephys, com destaque para a janela que disponibiliza a instalação do <i>plugin</i> de detecção de <i>ripples</i> . . . . .	68
Figura 9 – Referências para o posicionamento dos eletrodos durante a cirurgia estereotáxica e detalhes da construção do implante. . . . .	75
Figura 10 – Protocolo experimental do labirinto de Barnes. . . . .	78
Figura 11 – Estimação de pose usando o DeepLabCut e extração de parâmetros comportamentais. . . . .	81
Figura 12 – Sistema para registro e estimulação em malha fechada. . . . .	84
Figura 13 – Classificação do ciclo sono/vigília. . . . .	88
Figura 14 – Latência primária, erro primário e erro secundário durante os dias de aquisição no labirinto de Barnes. . . . .	91
Figura 15 – Distância primária e velocidade média durante os dias de aquisição no labirinto de Barnes. . . . .	92
Figura 16 – Estratégias usadas para encontrar o escape durante a fase de aquisição no labirinto de Barnes. . . . .	93
Figura 17 – Tempo despendido em cada quadrante durante a etapa de teste no labirinto de Barnes. . . . .	96
Figura 18 – Trajetória dos animais na sessão de teste do dia D16. . . . .	97
Figura 19 – Tempo despendido nos quadrantes Q1 e Q3 em intervalos de 30 segundos na sessão de teste do dia D16. . . . .	98
Figura 20 – Número de <i>head dips</i> nas sessões de teste dos dias D5 e D16. . . . .	100
Figura 21 – Velocidade e distância percorrida dos na etapa de teste do labirinto de Barnes. . . . .	101
Figura 22 – Exemplos representativos de hipnogramas e PSDs de dois animais. . . . .	105
Figura 23 – Tempo despendido em cada estágio do ciclo sono/vigília ao longo dos dias de aprendizado no labirinto de Barnes. . . . .	107

Figura 24 – Taxa de <i>bouts</i> em cada estágio do ciclo sono/vigília ao longo dos dias de aprendizado no labirinto de Barnes. . . . .	109
Figura 25 – Verificação dos estados em torno dos eventos de estimulação: a aplicação dos estímulos não promove transição de estados. . . . .	110
Figura 26 – Capturas de tela do sistema de registro e estimulação em funcionamento.	114
Figura 27 – Ocorrência de <i>ripples</i> antes e durante a fase de aquisição no labirinto de Barnes. . . . .	116
Figura 28 – Abolição de <i>ripples</i> : efeitos no LFP em resposta à aplicação de estímulos elétricos de diferentes intensidades. . . . .	118
Figura 29 – Estimulação elétrica na VHC interrompe os eventos de <i>ripples</i> . . . . .	120
Figura 30 – Verificação histológica do posicionamento dos eletrodos. . . . .	122
Figura 31 – Disparos seletivos durante delta. . . . .	137
Figura 32 – Protocolo experimental. . . . .	141
Figura 33 – Sistema para registro e manipulação optogenética em malha fechada. . . . .	143
Figura 34 – Preparação dos componentes para a construção do implante de registro eletrofisiológico e manipulação optogenética. . . . .	146
Figura 35 – Posicionamento do LED sobre o ferrule e resultado final do implante. . . . .	149
Figura 36 – Experimento-piloto de inibição optogenética em malha fechada. . . . .	151
Figura 37 – Imagem de fluorescência (GFP) de fatias dos encéfalos dos animais R22 e R23 confirmando a expressão de ArchT. . . . .	153
Figura 38 – Correlação entre indicadores de desempenho da aquisição (D4) e o tempo despendido no quadrante-alvo na etapa de teste (D16). . . . .	181
Figura 39 – Correlação entre indicadores de desempenho da aquisição (D4) e o número de visitas a buracos do quadrante-alvo na etapa de teste (D16). . . . .	182

# Lista de tabelas

Tabela 1 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 14. . . . .	94
Tabela 2 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 15. . . . .	94
Tabela 3 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 16. . . . .	95
Tabela 4 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 17. . . . .	101
Tabela 5 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 19. . . . .	102
Tabela 6 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 20. . . . .	103
Tabela 7 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 21. . . . .	103
Tabela 8 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 23. . . . .	112
Tabela 9 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 24. . . . .	113
Tabela 10 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 27. . . . .	117
Tabela 11 – Materiais de consumo e equipamentos necessários para a construção do implante de fibra óptica. . . . .	144
Tabela 12 – Endereços eletrônicos dos <i>websites</i> de fornecedores dos componentes para a construção do implante de fibra óptica. . . . .	145

# Lista de abreviaturas e siglas

ACC	<i>anterior cingulate cortex</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	ântero-posterior
art-ANOVA	<i>aligned ranks transformation ANOVA</i>
BM	<i>Barnes maze</i>
CEBIO	Centro de Bioterismo do ICB-UFMG
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DV	dorso-ventral
EMG	eletromiograma
EPSP	<i>excitatory postsynaptic potential</i>
fEPSP	<i>field EPSP</i>
FFT	<i>fast Fourier transform</i>
FPR	<i>false positive rate</i>
GABA	ácido gama-aminobutírico
GMM	<i>gaussian mixture model</i>
GUI	<i>graphical user's interface</i>
HDF5	<i>Hierarchical Data Format v5</i>
HPC	hipocampo
HPSM	Hipótese de Plasticidade Sináptica e Memória
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IED	<i>interictal epileptiform discharges</i>
IL	infra-límbica
LANEC	Laboratório Institucional de Neurociências Molecular e Comportamental

LED	<i>light-emitting diode</i>
LFP	<i>local field potential</i>
LTD	<i>long-term depression</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i>
MCP	memória de curto prazo
ML	médio-lateral
MLP	memória de longo prazo
mPFC	<i>medial prefrontal cortex</i>
MUA	<i>multiunit activity</i>
MT	memória de trabalho
NREM	<i>non-rapid eye movement</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PFA	paraformaldeído
PL	pré-límbica
PSD	<i>power spectral density</i>
REM	<i>rapid eye movement</i>
RM ANOVA	<i>repeated measures ANOVA</i>
RMS	<i>root mean square</i>
SCH	<i>systems consolidation hypothesis</i>
SHY	<i>synaptic homeostasis hypothesis</i>
SM	septo medial
SPI	<i>Serial Peripheral Interface</i>
STDP	<i>spike timing-dependent plasticity</i>
SWR	<i>sharp wave-ripple</i>
TECS	<i>Technology Enhanced Clad Silica</i>
TPR	<i>true positive rate</i>

UFMG      Universidade Federal de Minas Gerais

USD      *United States dollar*

VHC      *ventral hippocampal commissure*

# Sumário

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
1.1	O caso do paciente H.M. e o início da era moderna do estudo da memória	19
1.2	Formação de memória e plasticidade neural	21
1.3	Modelo de formação de memória em dois estágios	22
1.4	Caracterização anatômica da via hipocampo-mPFC	24
1.5	O papel do sono na consolidação de memórias declarativas	25
1.5.1	Sono	26
1.5.2	Privação de sono e os prejuízos na formação de memória	27
1.5.3	A descoberta das <i>place cells</i> : uma ponte entre a vigília e o sono	28
1.5.4	<i>Replay</i> , plasticidade sináptica e formação de memória durante o sono	29
1.5.5	Consolidação da memória durante o sono REM	31
1.6	<b><i>Sharp wave-ripples</i></b>	32
1.6.1	SWRs sincronizadas com eventos corticais delta e <i>spindle</i>	35
1.7	<b>Avaliação da memória espacial utilizando o labirinto de Barnes</b>	37
1.8	<b>Proposta e relevância deste trabalho</b>	38
2	<b>OBJETIVOS</b>	40
I	<b>DESENVOLVIMENTO DE UM <i>PLUGIN</i> PARA DETECÇÃO DE <i>RIPPLES</i> EM TEMPO REAL</b>	41
3	I: INTRODUÇÃO	42
4	I: DESENVOLVIMENTO DE UM <i>PLUGIN</i> PARA DETECÇÃO DE <i>RIPPLES</i> INTEGRADO À GUI DO OPEN EPHYS	43
5	I: DISCUSSÃO COMPLEMENTAR	67
II	<b>PERTURBAÇÃO DE <i>RIPPLES</i> DURANTE O SONO PÓS-APRENDIZADO NO LABIRINTO DE BARNES</b>	69
6	II: INTRODUÇÃO	70
7	II: OBJETIVOS	72
8	II: MÉTODOS	73

<b>8.1</b>	<b>Sujeitos experimentais</b>	<b>73</b>
<b>8.2</b>	<b>Cirurgia estereotáxica</b>	<b>73</b>
8.2.1	Anestesia	73
8.2.2	Cirurgia estereotáxica e implante dos eletrodos	74
<b>8.3</b>	<b>Lesão eletrolítica, extração e fixação dos encéfalos</b>	<b>76</b>
<b>8.4</b>	<b>Histologia</b>	<b>76</b>
<b>8.5</b>	<b>Labirinto de Barnes</b>	<b>77</b>
8.5.1	Aparato experimental	77
8.5.2	Local e condições de experimentação	77
8.5.3	Protocolo experimental	77
8.5.4	Breve epílogo metodológico: adaptações no protocolo do labirinto de Barnes	79
<b>8.6</b>	<b>Análise dos vídeos das sessões no labirinto de Barnes</b>	<b>80</b>
8.6.1	Pré-processamento dos vídeos	80
8.6.2	Estimação automática de pose com o DeepLabCut	80
8.6.3	Extração de métricas comportamentais	81
<b>8.7</b>	<b>Registro e estimulação em malha fechada</b>	<b>83</b>
8.7.1	Arquitetura de <i>hardware</i>	83
8.7.2	Registro eletrofisiológico	83
8.7.3	Deteção de <i>ripples</i> em tempo real e estimulação	83
<b>8.8</b>	<b>Classificação dos estágios do ciclo sono/vigília</b>	<b>85</b>
8.8.1	Pré-processamento dos registros	85
8.8.2	Cálculo de potência de banda e de RMS do EMG	86
8.8.3	GMM e classificação dos estados	86
<b>8.9</b>	<b>Análises estatísticas</b>	<b>87</b>
<b>8.10</b>	<b>Análise de eventos eletrofisiológicos</b>	<b>88</b>
8.10.1	Deteção <i>offline</i> de <i>ripples</i>	88
8.10.2	Cálculo de duração das <i>ripples</i>	89
<b>9</b>	<b>II: RESULTADOS E ANÁLISES</b>	<b>90</b>
<b>9.1</b>	<b>Desempenho no labirinto de Barnes</b>	<b>90</b>
9.1.1	Etapa de aquisição	90
9.1.2	Etapa de teste	95
<b>9.2</b>	<b>Estrutura do sono</b>	<b>104</b>
<b>9.3</b>	<b>Análise das SWRs</b>	<b>113</b>
<b>9.4</b>	<b>Histologia</b>	<b>120</b>
<b>10</b>	<b>II: DISCUSSÃO</b>	<b>123</b>
<b>10.1</b>	<b>Aprendizado no labirinto de Barnes: diálogo com outros trabalhos</b>	<b>124</b>
10.1.1	Aspectos comportamentais	124
10.1.2	Arquitetura do sono pós-aprendizado	127

10.1.3	Ocorrência e duração das <i>ripples</i> . . . . .	129
10.2	<b>Decaimento na taxa de SWRs ao longo das horas e homeostase sináptica</b> . . . . .	<b>130</b>
10.3	<b>Preferência do grupo perturbação de <i>ripples</i> pelo quadrante oposto</b>	<b>131</b>
10.4	<b>Perspectivas futuras: experimentos complementares com o BM</b> . . .	<b>132</b>
<b>III</b>	<b>PREPARAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE MANIPULAÇÃO CORTICAL EM MALHA FECHADA USANDO OPTOGENÉTICA</b>	<b>134</b>
11	<b>III: INTRODUÇÃO</b> . . . . .	<b>135</b>
11.1	<b>Manipulação cortical em malha fechada com optogenética</b> . . . . .	<b>135</b>
11.2	<b>Implante fibra-eletrodo: transferência de tecnologia e redução de custos</b> . . . . .	<b>137</b>
12	<b>III: OBJETIVOS</b> . . . . .	<b>139</b>
13	<b>III: MÉTODOS</b> . . . . .	<b>140</b>
13.1	<b>Sujeitos experimentais</b> . . . . .	<b>140</b>
13.2	<b>Protocolo experimental</b> . . . . .	<b>140</b>
13.3	<b>Cirurgia estereotáxica</b> . . . . .	<b>140</b>
13.3.1	Cirurgia para infusão do vetor viral . . . . .	141
13.3.2	Cirurgia para implante da fibra óptica e dos eletrodos de registro . . . . .	142
13.4	<b>Arquitetura de <i>hardware e software</i></b> . . . . .	<b>142</b>
13.5	<b>Imageamento de fluorescência</b> . . . . .	<b>142</b>
14	<b>III: RESULTADOS E ANÁLISES</b> . . . . .	<b>144</b>
14.1	<b>Construção do implante para registro eletrofisiológico e manipulação optogenética</b> . . . . .	<b>144</b>
14.1.1	Materiais e custos . . . . .	144
14.1.2	Preparação da fibra óptica . . . . .	145
14.1.3	Preparação do ferrule . . . . .	147
14.1.4	Inserção da fibra no ferrule . . . . .	147
14.1.5	Preparação e posicionamento do LED . . . . .	148
14.1.6	Fixação do eletrodo na fibra óptica . . . . .	149
14.1.7	Finalização do implante com epóxi opaco . . . . .	150
14.2	<b>Experimentos preliminares de inibição cortical em malha fechada</b> . .	<b>150</b>
14.3	<b>Expressão de ArchT</b> . . . . .	<b>152</b>
15	<b>III: DISCUSSÃO</b> . . . . .	<b>154</b>

16	CONCLUSÕES GERAIS . . . . .	156
17	LIMITAÇÕES DO TRABALHO . . . . .	157
18	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS . . . . .	159
	REFERÊNCIAS . . . . .	161
	APÊNDICES	180

# 1 Introdução

Existem vários processos neurais que nos permitem interpretar o ambiente que nos circunda e atuar sobre ele de maneira orientada. Dentre eles, a memória merece destaque. Memória pode ser definida como o processo pelo qual é possível armazenar e recuperar (evocar) informações adquiridas por meio de experiências, enquanto que aprendizado é o processo de aquisição de novas memórias (SQUIRE, 2009b; BISAZ; TRAVAGLIA; ALBERINI, 2014). Como bem colocado por Camina e Güell (2017), a ausência de memória tornaria a vida repleta de eventos desconectados, de erros que não conduzem a nenhuma lição e de emoções sem a capacidade de nos lembrarmos delas. Memória é precisamente a habilidade que nos permite conectar experiências, aprender e atribuir sentido às próprias ações (CAMINA; GÜELL, 2017).

## 1.1 O caso do paciente H.M. e o início da era moderna do estudo da memória

Em 1957, Brenda Milner e William Scoville publicaram um trabalho que veio a se tornar um importante marco na história da neurociência comportamental e no estudo da memória (SCOVILLE; MILNER, 2009). Nele, é descrito o caso do paciente H.M., que foi submetido a uma cirurgia de ressecção bilateral de parte do lobo temporal medial como tratamento para incessantes crises de epilepsia. O procedimento, de fato, contribuiu para o controle das crises, mas H.M. passou a apresentar grave prejuízo na formação de novas memórias. Mesmo assim, um amplo arcabouço de funções cognitivas e de memórias remotas foi mantido intacto (SQUIRE, 2009a). Esses achados estabeleceram dois importantes princípios no campo do estudo sobre a memória: 1) o de que a memória é uma função cerebral distinta e separada de outros processos cognitivos; 2) o de que as estruturas do lobo temporal não são o repositório último de memórias remotas (SQUIRE, 2009a).

No caso do paciente H.M., as memórias afetadas foram apenas as declarativas. Memórias declarativas são aquelas que se referem ao conhecimento consciente de fatos e eventos e que representam modelos do mundo externo (SQUIRE, 2009b). Elas são expressas por meio da recordação e normalmente são passíveis de serem verbalizadas. A capacidade de se lembrar da última refeição realizada ou do caminho até a biblioteca mais próxima são exemplos de memórias declarativas. Esse tipo de memória se opõe às não declarativas, como as que envolvem o aprendizado de alguma habilidade motora ou que formam um hábito, por exemplo, e que são expressas pelo desempenho e pela prática. De acordo com Squire (2009b), nas memórias não declarativas, a experiência modifica o comportamento sem demandar a consciência de um conteúdo de memória ou mesmo a

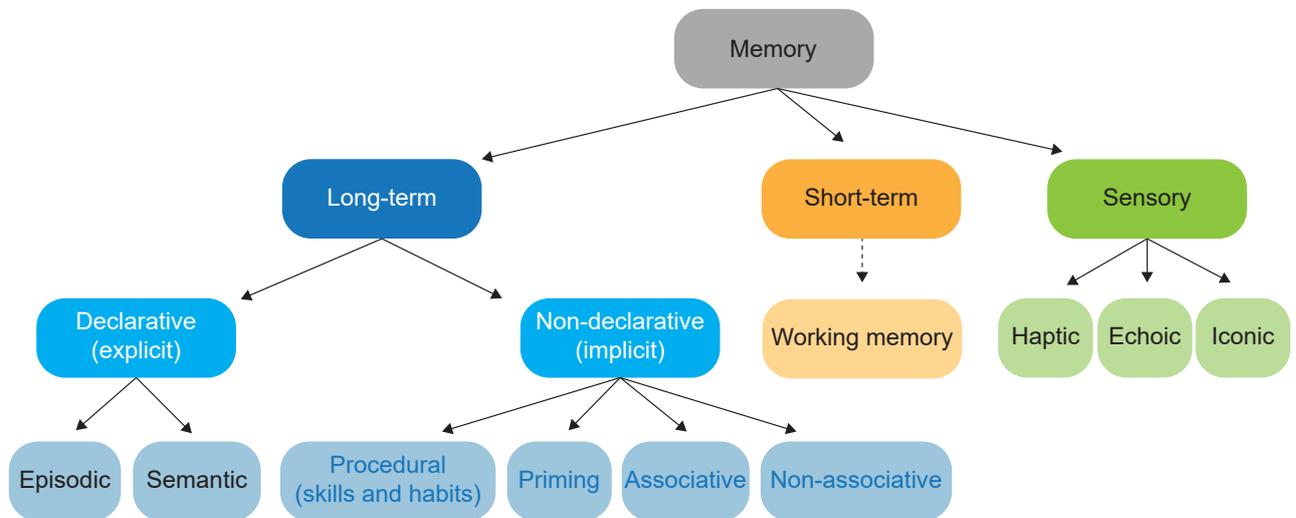
experiência de que a memória esteja sendo usada. Andar de bicicleta, por exemplo, é uma situação comum de uso de uma memória não declarativa. Apesar de o paciente H.M. ter sido capaz de desempenhar normalmente uma tarefa de aprendizado visomotor (memória não declarativa), ele não se lembrava de ter realizado tal tarefa ao final dos três dias de teste (MILNER, 1965). Esses achados evidenciaram outro importante princípio no campo da neurociência comportamental: o de que existem múltiplos sistemas de memória.

Atualmente, a existência de múltiplos sistemas de memória é amplamente aceita (IZQUIERDO et al., 1999; EICHENBAUM; COHEN, 2004; SQUIRE, 2004; CAMINA; GÜELL, 2017). Em termos funcionais, os sistemas de memória podem ser definidos em três grandes categorias: memórias sensoriais, memórias de curto prazo e memória de longo prazo (Figura 1) (CAMINA; GÜELL, 2017). A memória sensorial trata da retenção de informações sensoriais por um breve período, imediatamente após a interrupção dos estímulos que as originaram. Ela tem duração de algumas centenas de milissegundos e é classicamente dividida em três tipos: icônica (visual), háptica (tátil) e ecoica (auditiva). Já a memória de curto prazo é definida como a habilidade de manter uma pequena quantidade de informação disponível por um curto período de tempo. Ela se desenvolve em poucos segundos ou minutos e pode ser acessada por até algumas horas (IZQUIERDO et al., 1999). De acordo com o modelo mais bem estabelecido, a memória de curto prazo não representa uma etapa intermediária para a formação de memória de longo prazo, mas um conjunto independente de sistemas (IZQUIERDO et al., 1999; CAMINA; GÜELL, 2017).

A memória de trabalho torna possível o armazenamento transitório e a manipulação de informações necessárias para tarefas cognitivas complexas, tais como compreensão de linguagem, aprendizado e raciocínio (BADDELEY, 2010). Ela é adquirida imediatamente e dura segundos ou poucos minutos (IZQUIERDO et al., 1999). Apesar de sua natureza temporal de curta duração, a memória de trabalho se distingue daquilo que é definido como memória de curto prazo (CAMINA; GÜELL, 2017). Ela constitui um sistema de armazenamento e processamento temporário, enquanto que as memórias de curto e longo prazo são sistemas cujo objetivo principal é preservar informações para o acesso futuro, quando demandadas (IZQUIERDO et al., 1999).

Já a memória de longo prazo se refere ao armazenamento de informações que serão mantidas por longos períodos, até mesmo por uma vida inteira (SQUIRE, 2004; CAMINA; GÜELL, 2017). Os dois subtipos de memórias de longo prazo são aqueles já descritos anteriormente: as declarativas (explícitas), cuja formação foi prejudicada no paciente H.M. com a ressecção parcial do lobo temporal, e as não declarativas (implícitas). As memórias declarativas episódicas são aquelas que envolvem informações sobre experiências e eventos do dia-a-dia, tipicamente associadas com o tempo e o espaço em que ocorreram (DICKERSON; EICHENBAUM, 2010). Já as declarativas semânticas lidam com a representação de conceitos de linguagem, necessárias para atividades como o raciocínio, o planejamento do futuro ou a reminiscência sobre o passado (MAHON; CARAMAZZA, 2008). Por fim,

Figura 1 – Taxonomia funcional dos sistemas de memória.



Fonte: adaptada de Squire (2004) e Camina e Güell (2017).

e de maneira resumida, as memórias não declarativas operam na ausência de consciência e são divididas em quatro modalidades: procedurais (habilidades motoras), associativas (condicionamento clássico e operante), não associativas (habituação e sensibilização) e *priming* (exposição prévia a um estímulo influencia na resposta a estímulos posteriores).

## 1.2 Formação de memória e plasticidade neural

Quais seriam as alterações celulares que levariam à aquisição e persistência das memórias? Em se tratando dos mecanismos de aprendizado e formação de memória no nível celular, é bem aceito o conceito formulado por Hebb (1949) de que as conexões entre dois neurônios é fortalecida quando a ativação de um deles (pré-sináptico) está consistentemente sincronizada com a ativação do outro (pós-sináptico). Esse efeito tornaria mais provável a ativação futura dos neurônios envolvidos, constituindo um modelo capaz de acomodar a ideia de aprendizado em nível celular. O fenômeno biológico que dá sustentação ao conceito proposto por Hebb foi descrito no início da década de 1970 e ficou conhecido como LTP (potenciação de longo prazo; do inglês, *long-term potentiation*) (BLISS; LOMO, 1973). A LTP é caracterizada por um aumento duradouro na eficiência das sinapses entre os neurônios quando estes são estimulados de maneira recorrente, síncrona e ordenada (COOKE, 2006).

Atuando de forma oposta à LTP, um fenômeno de enfraquecimento da eficiência sináptica, denominado LTD (depressão de longo prazo; do inglês, *long-term depression*), também foi descrito anos mais tarde (LEVY; STEWARD, 1979). Mesmo que possuam papéis opostos na determinação da força de conexões neuronais, LTP e LTD atuam de forma complementar quando se trata do processo de formação de memória (VITUREIRA;

GODA, 2013). Ambos os fenômenos estão integrados à hipótese de plasticidade sináptica e memória (HPSM), que relaciona três processos neuronais necessários e suficientes para a codificação, persistência e evocação de memórias: 1) ajustes finos das forças sinápticas ao longo do tempo; 2) estabilização dos pesos sinápticos e 3) reativação dos padrões espaço-temporais formados anteriormente (TAKEUCHI; DUSZKIEWICZ; MORRIS, 2014).

Os fenômenos de LTP e LTD estão associados a alterações plásticas nos neurônios que servem de arcabouço para explicar a formação de memória em nível celular. No entanto, e até em razão da complexidade das representações de memória, é difícil entender a totalidade desse processo sem considerar um modelo de mais alta ordem, que compreenda a interação entre diferentes circuitos e regiões cerebrais. A seção a seguir apresenta um importante modelo de formação de memória em nível de sistemas.

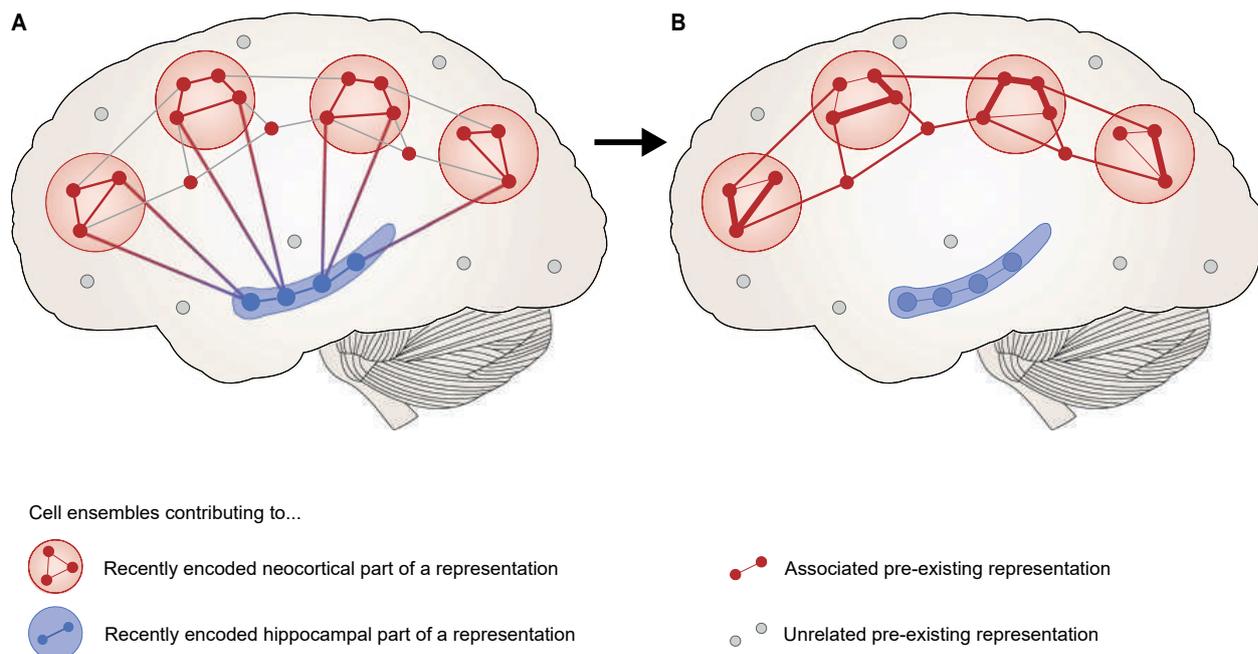
### 1.3 Modelo de formação de memória em dois estágios

Desde a publicação do caso do paciente H.M., muito se avançou na direção de elucidar os processos de formação das memórias declarativas. Para que possam ser evocadas no longo prazo, elas precisam primeiro passar por uma etapa de aquisição (ABEL; LATTAL, 2001). A aquisição consiste na captura e na codificação inicial das diversas impressões sensoriais que constituem a experiência, configurando o primeiro estágio do aprendizado. Em seguida, os traços de memória recém-formados passam pelo processo de consolidação. Consolidação se traduz na transformação de uma memória temporária, ainda vulnerável, em uma representação mais estável, que persiste no longo prazo (SQUIRE et al., 2015).

O modelo mais aceito atualmente para explicar a formação de memórias declarativas propõe que a aquisição e a consolidação dependam de uma interação entre hipocampo e redes neocorticais, que ocorre em duas etapas (MARR, 1971; MCCLELLAND; MCNAUGHTON; O'REILLY, 1995; FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; BORN; WILHELM, 2012; KLINZING; NIETHARD; BORN, 2019). Em um primeiro momento, as codificações iniciais dos vários aspectos da experiência, que se encontram distribuídas em diferentes regiões do cérebro, são reunidas e integradas no hipocampo para formar os primeiros traços de memória. Nessa etapa, a influência das projeções externas no hipocampo é privilegiada em comparação com a atividade interna intrínseca, favorecendo o processamento sensorial e o fluxo de informação no sentido do córtex para o hipocampo (HASSELMO, 1999; GIRARDEAU; ZUGARO, 2011). Na segunda etapa, as representações de memória são gradualmente “transferidas” do hipocampo para regiões corticais associativas, onde são consolidadas e integradas às redes de representações já existentes (Figura 2).

A palavra “transferidas” serve como um recurso didático preliminar, mas ela agrega imprecisões que merecem ser melhor elucidadas. Durante o momento da aquisição, a informação é codificada paralelamente em redes neocorticais e no hipocampo. Nessa etapa,

Figura 2 – Modelo de formação de memória em dois estágios. **(A)** Inicialmente, a representação recém-codificada de uma experiência está distribuída em redes neocorticais e no hipocampo, o qual integra as características da experiência e contribui mais ativamente no processamento inicial da formação dos traços de memória. **(B)** Em um segundo momento, as representações são estabilizadas nas redes do neocórtex e integradas a outras memórias já existentes. Os traços de memória já consolidados são estabelecidos em redes neocorticais e se tornam mais independentes do hipocampo.



Fonte: adaptada de [Klinzing, Niethard e Born \(2019\)](#).

a construção dos traços de memória é bastante dependente do hipocampo ([BORN; WILHELM, 2012](#)). Já no período de consolidação, mudanças graduais no neocórtex que começaram ainda no momento da aquisição estabelecem uma memória de longo prazo estável, por meio do aumento da complexidade, da distribuição e da conectividade entre múltiplas regiões corticais ([SQUIRE et al., 2015](#); [DUDAI; MORRIS, 2013](#)). A partir desse ponto, à medida que o processo de consolidação ocorre, a memória se torna cada vez mais independente dos circuitos hipocámpicos. [Frankland e Bontempi \(2005\)](#) sintetizam bem todo esse processo: o hipocampo atua no armazenamento temporário de novas informações, mas o armazenamento permanente depende de uma rede cortical amplamente distribuída.

O processo de formação de memória em dois estágios, que envolve a redistribuição de representações entre diferentes sistemas do cérebro, está associado ao termo “consolidação de sistemas” ([BORN; WILHELM, 2012](#)). Tal expressão é comumente utilizada em contraste com a “consolidação sináptica”, que implica o fortalecimento de representações de memória no nível sináptico e se refere a mudanças nas conexões em circuitos neuronais

localizados (DUDAI, 2004). Além disso, o termo “consolidação de sistemas” também dá nome a uma importante hipótese que busca explicar, dentro do modelo de dois estágios, os mecanismos da consolidação promovida pelo diálogo hipocampo-córtex (GIRARDEAU; ZUGARO, 2011). Mais detalhes sobre essa hipótese serão elucidados mais adiante neste texto.

Na interação entre áreas que caracteriza a consolidação de memórias declarativas em nível de sistemas, é bem conhecido que o hipocampo atua como um dos protagonistas. Já dentre as regiões neocorticais associativas que participam desse diálogo e, consequentemente, da persistência da memória no longo prazo, o córtex pré-frontal medial (mPFC) merece destaque (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). A próxima seção aborda algumas características anatômicas do hipocampo e do mPFC, assim como as conexões entre essas duas estruturas.

## 1.4 Caracterização anatômica da via hipocampo-mPFC

A importância do diálogo entre hipocampo e mPFC no processo de consolidação de memórias declarativas é apontada em diversos estudos (LAROUCHE; DAVIS; JAY, 2000; EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012; PRESTON; EICHENBAUM, 2013; GENZEL et al., 2017). Em modelos animais, por exemplo, a execução de tarefas que envolvem a formação de memórias espaciais (LAROUCHE; DAVIS; JAY, 2000; WIRT; HYMAN, 2017) e contextuais aversivas (ROZESKE et al., 2015; KITAMURA et al., 2017) está relacionada com a comunicação entre o hipocampo e o mPFC. Em humanos, alterações na interação hipocampo-mPFC estão diretamente associadas com vários tipos de prejuízo na formação de memórias e na execução de outras funções cognitivas (JIN; MAREN, 2015; RUGGIERO et al., 2021).

A caracterização anatômica das vias que conectam hipocampo e mPFC pode contribuir para o entendimento da relevância da interação entre essas regiões na formação de memórias. Adicionalmente, também auxilia na compreensão dos mecanismos de comunicação entre elas e dos fatores de modulação envolvidos. Antes de abordar as conexões entre hipocampo e mPFC, uma breve descrição de tais estruturas é apresentada a seguir.

A formação hipocampal está localizada no lobo temporal e é constituída pelas áreas Cornu Ammonis (CA1, CA2 e CA3), pelo giro denteado, pelo complexo subicular e pelo córtex entorrinal (ANDERSEN et al., 2006; RUGGIERO et al., 2021). Em roedores, o hipocampo apresenta uma estrutura que se estende da porção dorsal (septal) até a ventral (temporal), enquanto que nos humanos esse prolongamento se dá do eixo posterior ao anterior (STRANGE et al., 2014; RUGGIERO et al., 2021). Estudos de lesão e de conectividade indicam uma diferenciação funcional entre a parte dorsal do hipocampo, associada principalmente com o processamento de memórias espaciais, e a ventral, res-

ponsável pela modulação de representações emocionais (MOSER; MOSER; ANDERSEN, 1993; RISOLD; SWANSON, 1996).

Em se tratando do córtex pré-frontal, vale pontuar que existe ainda um debate sobre as definições anatômicas e funcionais da região entre diferentes espécies (CARLÉN, 2017; LAUBACH et al., 2018). Aquilo que se considera ser o córtex pré-frontal nos primatas encontra difícil correspondência na definição aplicada ao cérebro dos roedores amplamente utilizados nas neurociências (CARLÉN, 2017). Com base na convenção mais aceita adotada para roedores (LAUBACH et al., 2018; HOWLAND et al., 2022), o mPFC pode ser dividido em três áreas principais: o córtex cingulado anterior (ACC, do inglês, *anterior cingulate cortex*), a região pré-límbica (PL) e a região infra-límbica (IL).

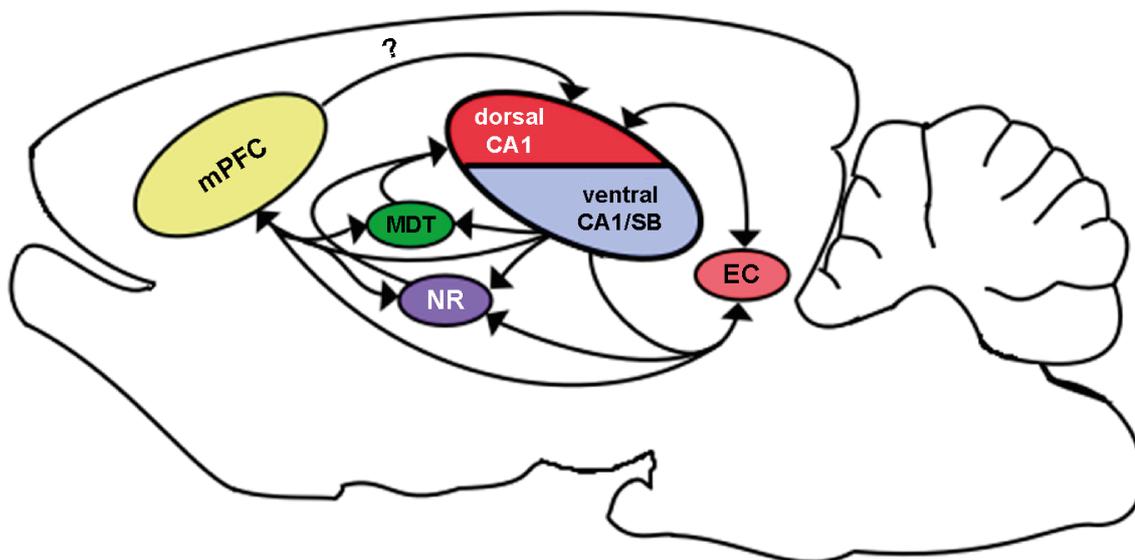
O hipocampo e o mPFC estão conectados por múltiplas vias, tanto diretas (monossinápticas) quanto indiretas (polissinápticas) (SIGURDSSON; DUVARCI, 2016; WIRT; HYMAN, 2017; RUGGIERO et al., 2021). A Figura 3 sintetiza as conexões mais relevantes. De maneira resumida, projeções monossinápticas glutamatérgicas do hipocampo para o mPFC se originam na região de CA1 do hipocampo ventral/intermediário e no subículo (SWANSON, 1981). Elas então alcançam as regiões ACC, IL e PL do mPFC. Também há projeções indiretas do hipocampo para o mPFC, que passam pelo núcleo reuniens, córtex entorrinal e pelo núcleo dorsomedial do tálamo. Neurônios do mPFC, por sua vez, parecem apresentar projeções monossinápticas que partem do ACC e atingem as regiões de CA1 e CA3 do hipocampo dorsal (dHPC) (RAJASETHUPATHY et al., 2015). No entanto, evidências mais recentes colocam em dúvida a existência da via direta mPFC-dHPC (VERTES; LINLEY; VIENA, 2022; ANDRIANOVA et al., 2023). Interessantemente, projeções indiretas do mPFC para o dHPC possuem como estruturas intermediárias as mesmas que integram a via contrária: córtex entorrinal, núcleo reuniens e núcleo talâmico dorsomedial (WIRT; HYMAN, 2017). Tais regiões intermediárias caracterizam pontos de conexão recíproca entre hipocampo e mPFC.

Até este ponto do texto, as informações trazidas dentro do contexto do modelo de dois estágios contemplaram, principalmente, as regiões envolvidas e as conexões anatômicas entre elas. Ou seja, foi abordado brevemente o aspecto do “onde” os processos de consolidação das memórias declarativas ocorrem. Mas em quais momentos e de que maneira esses processos se desenvolvem? As próximas seções apresentam os modelos e hipóteses que tentam explicar o “quando” e o “como” a consolidação de memórias declarativas acontece.

## 1.5 O papel do sono na consolidação de memórias declarativas

No início da década de 1920, Jenkins e Dallenbach (1924) replicaram o clássico experimento proposto por Hermann Ebbinghaus, mas com algumas adaptações (RIBEIRO,

Figura 3 – Conexões relevantes entre hipocampo e mPFC. NR: núcleo reuniens, MDT: núcleo dorsomedial do tálamo, SB: subículo, EC: córtex entorrinal.



Fonte: adaptada de Wirt e Hyman (2017).

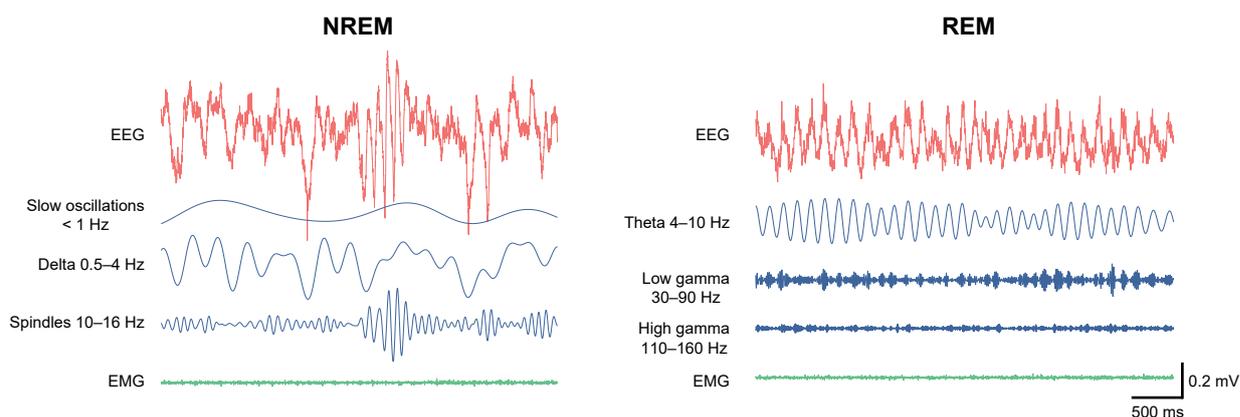
2019). O experimento original consistia em apresentar aos participantes uma sequência de sílabas cuja retenção seria medida com o passar do tempo. Ebbinghaus já havia demonstrado que a memória desse conjunto de sílabas decaía de forma exponencial ao longo do tempo. A inovação proposta por Jenkins e Dallenbach foi a inclusão de um grupo de participantes que deveriam dormir após a tarefa de memorização. Curiosamente, a retenção após o sono foi bem maior em comparação com a dos participantes que se mantiveram acordados (RIBEIRO, 2019). Atualmente, é bem conhecido o papel fundamental que o sono possui na consolidação de memórias declarativas (DIEKELMANN; BORN, 2010; BORN; WILHELM, 2012; MARSHALL et al., 2020).

### 1.5.1 Sono

O sono é caracterizado por um estado de inconsciência reversível produzido pelo corpo, de baixa responsividade a estímulos externos, com reduzida atividade muscular, e que promove a regulação de diversos sistemas fisiológicos (HOBSON; PACE-SCHOTT, 2002; KANDEL et al., 2013; ADAMANTIDIS; HERRERA; GENT, 2019). Em mamíferos, o sono é dividido em duas fases principais que ocorrem de forma alternada: o sono REM (do inglês, *rapid eye movement*) e o sono de ondas lentas (SWS, do inglês, *slow-wave sleep*), também chamado de não-REM (NREM). Nos humanos, cada ciclo NREM-REM tem duração entre 90 e 110 minutos (MEMAR; FARADJI, 2018), de modo que uma noite de sono contém de 4 a 6 ciclos.

O sono NREM está associado com a redução da responsividade a estímulos externos, da temperatura corporal, da consciência do ambiente e com a estabilização da

Figura 4 – Oscilações de EEG típicas dos estágios de sono REM e NREM. Registros de EEG típicos do sono NREM (à esquerda) e REM (à direita) são acompanhados dos sinais filtrados em diferentes faixas de frequência. No sono NREM predominam as oscilações de mais baixa frequência e alta amplitude, tais como delta, *spindles* e ondas lentas. Já no sono REM, há uma presença mais marcante de teta e de gama, dividida em gama baixo (30-90 Hz) e gama alto (110-160 Hz). O sinal do eletromiograma (EMG) permanece baixo durante os dois estágios do sono.



Fonte: adaptada de Adamantidis, Herrera e Gent (2019).

frequência cardíaca (ADAMANTIDIS; HERRERA; GENT, 2019). Em termos de atividade registrada via eletroencefalograma (EEG), no sono NREM há o predomínio de oscilações de mais baixa frequência, tais como *spindles* (~10-16 Hz), delta (~0,5-4 Hz) e as ondas lentas (<1 Hz), que dão nome a esse estágio do sono (MEMAR; FARADJI, 2018; ADAMANTIDIS; HERRERA; GENT, 2019; MARSHALL et al., 2020). Já o sono REM, também chamado de sono paradoxal pela semelhança encefalográfica com o estado de vigília, é caracterizado pelo movimento rápido e irregular dos olhos, pela ausência de tônus muscular, pelo aumento da temperatura cerebral e por uma maior irregularidade nas frequências cardíaca e respiratória (ADAMANTIDIS; HERRERA; GENT, 2019). A atividade de EEG no sono REM é marcada por oscilações de mais alta frequência, como teta (~4-10 Hz) e gama (~30-90 Hz) (MARSHALL et al., 2020). A Figura 4 traz exemplos de registros de EEG dos estágios de sono REM e NREM.

### 1.5.2 Privação de sono e os prejuízos na formação de memória

Estudos como o de Jenkins e Dallenbach (1924) e, mais recentemente, de Marshall et al. (2006), mostram que o sono contribui ativamente para o fortalecimento dos traços de memória. Mais do que apenas fortalecer, o que diversos trabalhos de privação de sono têm mostrado é que esse estado desempenha uma função necessária para a formação de memórias (DONGEN et al., 2003; ALHOLA; POLO-KANTOLA, 2007; HAVEKES et al., 2016; CHEN et al., 2023). De acordo com Ribeiro (2019), o surgimento de evidências que atestam os prejuízos de memória causados pela privação de sono teve um *boom* no final

da década de 1960.

Em experimentos influenciados pelo clássico trabalho de Valatx, Jouvét e Jouvét (1964), roedores eram colocados sobre uma pequena plataforma circundada por água após uma tarefa de aprendizado. Assim que adormeciam, o tônus muscular dos animais era reduzido e eles entravam em contato com a água, despertando logo em seguida. A depender das dimensões da plataforma, e pelo fato de a redução do tônus muscular ser mais acentuada no sono REM do que no NREM, era possível fazer uma privação completa do sono ou que se limitasse aos períodos de REM. O que esses trabalhos mostraram é que a privação de sono pós-aprendizado gera impactos negativos na formação de memórias (RIBEIRO, 2019).

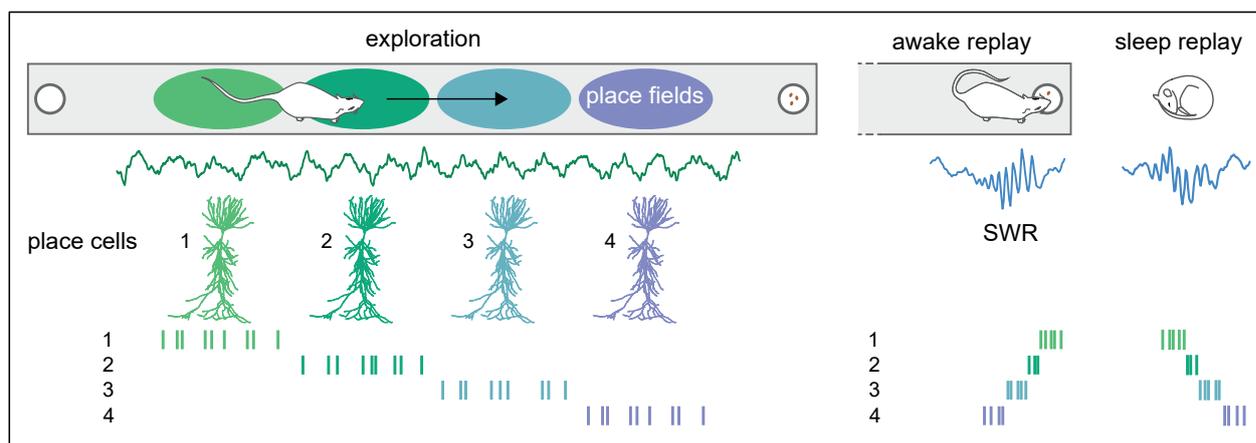
Uma crítica pertinente aos resultados desses estudos iniciais é a de que os possíveis efeitos do estresse causado pelo método de privação possam ter sido desconsiderados. No entanto, estudos mais recentes com métodos de privação menos estressores têm confirmado a noção de que a qualidade da formação de memória depende de um sono intacto (para uma revisão, ver Stepanski (2002), Alhola e Polo-Kantola (2007), Chen et al. (2023)). Por exemplo, ao empregar a técnica de *gentle handling* em camundongos, que consiste em agitar delicadamente a caixa dos animais quando eles entram no estado de sono, Havekes et al. (2016) relataram prejuízo no desempenho de uma tarefa de memória espacial. Adicionalmente, os autores mostram que esse prejuízo esteve associado com a redução de espinhas dendríticas na região de CA1, do hipocampo. São várias as possíveis perturbações de mecanismos neurofisiológicos que podem explicar os efeitos deletérios na consolidação de memória. Dentre elas estão a perturbação da plasticidade sináptica, alterações nos neurônios (danos, neuroinflamação, estresse oxidativo, perturbação da expressão de genes relacionados, perturbações na neurotransmissão) e alterações no ciclo circadiano (CHEN et al., 2023).

### 1.5.3 A descoberta das *place cells*: uma ponte entre a vigília e o sono

Novas possibilidades surgiram para o estudo do papel do sono na formação da memória depois da descoberta das *place cells* (células de lugar). As *place cells*, comumente documentadas nas regiões CA3 e CA1 do hipocampo, são neurônios piramidais que codificam de forma seletiva as posições do espaço (O'KEEFE; DOSTROVSKY, 1971; O'KEEFE; NADEL, 1978). Em outras palavras, esse tipo de neurônio se torna mais ativo quando o animal entra em uma região específica do ambiente, chamada de *place field* (Figura 5). Diferentes *place cells* codificam diferentes *place fields*, de modo que a ativação sequencial de um conjunto desses neurônios corresponde à representação de uma trajetória no espaço (MOSER; ROWLAND; MOSER, 2015).

A descoberta das *place cells* marcou a história das neurociências não apenas por revelar uma ligação confiável entre atividade neural e comportamento (MOSER; RO-

Figura 5 – A atividade sequencial das *place cells* durante a exploração espacial é repetida durante o sono subsequente. Durante o deslocamento em uma trajetória linear, a oscilação teta é registrada no hipocampo (registro verde) e células de lugar são sucessivamente ativadas à medida que o animal entra em seus respectivos *place fields* (GIRARDEAU; ZUGARO, 2011). A sequência de disparos das *place cells* é recapitulada durante o sono (ordem direta) e em momentos de descanso desperto (ordem reversa). Essa recapitulação ocorre durante *ripples* hipocampais.



Fonte: adaptada de Girardeau e Zugaro (2011).

WLAND; MOSER, 2015), mas também por representar uma ponte entre a experiência ocorrida durante a vigília e a consolidação durante o sono. Experimentos com as *place cells* mostraram que as mesmas células ativadas durante uma atividade de exploração espacial são reativadas durante o sono e em períodos de descanso subsequentes, mantendo a coerência também na sequência dos disparos (PAVLIDES; WINSON, 1989; KUDRIMOTI; BARNES; MCNAUGHTON, 1999; WILSON; MCNAUGHTON, 1994). A esse evento de recapitulação, que ocorre em alta frequência, é atribuído o nome de “*replay*”, ou recapitulação (Figura 5).

#### 1.5.4 *Replay*, plasticidade sináptica e formação de memória durante o sono

Ainda há muita discussão acerca dos fenômenos biológicos que explicam a relação entre os *replays* durante o sono e os processos de plasticidade sináptica e formação de memória. Existem evidências de que o *replay* promove a consolidação de memória durante o sono (DUPRET et al., 2010; BENDOR; WILSON, 2012; GIRARDEAU; INEMA; BUZSÁKI, 2017), assim como há estudos mostrando que a LTP é o mecanismo-chave na formação de alguns tipos de memória (DRAGOI; HARRIS; BUZSÁKI, 2003; PASTALKOVA et al., 2006; WHITLOCK et al., 2006; GOTO et al., 2021; LIAO et al., 2024). Além disso, foi reportado que o *replay* de *place cells* foi capaz de promover LTP na via CA3-CA1 do hipocampo em momentos específicos durante o sono (SADOWSKI; JONES; MELLOR, 2016). Porém, ainda faltam estudos que relacionem de forma inequívoca o fenômeno de recapitulação aos processos de plasticidade que dão suporte à consolidação.

Atualmente, uma das hipóteses mais influentes que buscam integrar todos esses fenômenos fisiológicos é a de consolidação de sistemas (SCH; do inglês, *systems consolidation hypothesis*) (FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; GIRARDEAU; ZUGARO, 2011; BORN; WILHELM, 2012; GOTO; HAYASHI, 2023). Ela propõe que a reativação coordenada de grupos celulares durante o sono possibilite a potenciação sináptica em redes neocorticais associativas, contribuindo para que alguns traços de memória se tornem mais independentes do hipocampo. Por também promoverem a reorganização da memória, com o neocórtex integrando várias experiências relacionadas e sobrepostas, tais processos resultariam em representações de maior nível de abstração, generalização e eficiência (KUMARAN; HASSABIS; MCCLELLAND, 2016; KLINZING; NIETHARD; BORN, 2019).

Uma hipótese alternativa à de consolidação de sistemas e que também vem sendo discutida ao longo dos últimos anos é a da homeostase sináptica (SHY, do inglês, *synaptic homeostasis hypothesis*) (TONONI; CIRELLI, 2003; TONONI; CIRELLI, 2020). A SHY defende que a transmissão sináptica é potencializada durante a vigília, quando novas informações estão sendo adquiridas, e reduzida durante o sono, particularmente no estágio de NREM. Portanto, o papel do sono na formação da memória seria o de reduzir globalmente a transmissão sináptica, evitando a saturação da rede e destacando, comparativamente, as conexões mais relevantes. Evidências consistentes com essa hipótese mostram, por exemplo, que neurônios do hipocampo aumentam progressivamente a taxa de disparo durante o estado acordado, a qual é reduzida durante o sono subsequente (MIYAWAKI; DIBA, 2016). Além disso, eventos oscilatórios associados com o *replay* durante o sono NREM geram redução das forças sinápticas no hipocampo de maneira semelhante à LTD (NORIMOTO et al., 2018).

De acordo com Joiner (2019), a SCH e a SHY, apesar de apresentarem diferenças consideráveis em suas concepções, estão ambas inseridas na proposta de particionamento que é o cerne do modelo de formação de memória em dois estágios. Na SCH, as informações adquiridas durante a vigília são processadas predominantemente pelo hipocampo. Durante o sono, os traços de memória recém-formados e ainda frágeis são estabilizados no neocórtex por meio de processos de potenciação sináptica. Por outro lado, na SHY, a potenciação sináptica que ocorre durante a vigília é balanceada pela depressão sináptica da rede durante o sono. Isso resultaria na manutenção das forças sinápticas dentro de uma faixa fisiológica em que fatores de modulação pudessem atuar adequadamente e, portanto, gerar respostas biologicamente relevantes (TONONI; CIRELLI, 2020). Essas duas hipóteses não são mutuamente exclusivas e é possível que funcionem em paralelo no cérebro. Uma condição necessária para tal é a demonstração de que um número limitado de sinapses selecionadas pode ser potencializado em um cenário global de redução da conectividade (GIRARDEAU; ZUGARO, 2011; GOTO; HAYASHI, 2023). Trabalhos como os de Turrigiano (1999) e Karlsson e Frank (2008), por exemplo, trazem evidências que atendem a essa condição. Os resultados desses autores sugerem que a LTP durante o sono

pode estar acompanhada de uma redução generalizada das forças sinápticas promovida pelo mecanismo de plasticidade homeostática (GOTO; HAYASHI, 2023). No entanto, trabalhos futuros ainda são necessários para melhor integrar essas duas hipóteses.

### 1.5.5 Consolidação da memória durante o sono REM

As hipóteses de consolidação de sistemas e de homeostase sináptica colocam atenção especial nos processos que ocorrem durante o sono NREM. No entanto, vários estudos trazem à luz evidências de que o sono REM também participa da formação de memórias (SMITH, 1996; RIBEIRO et al., 2002; RIBEIRO, 2007; POE; WALSH; BJORNESS, 2010; ALMEIDA-FILHO; QUEIROZ; RIBEIRO, 2018; LENDNER et al., 2023). Há hipóteses que defendem, por exemplo, que os eventos de LTP são facilitados durante o sono REM, contribuindo para a manutenção da plasticidade sináptica ao longo do tempo (RIBEIRO, 2007).

O mecanismo de consolidação durante o sono REM parece estar bastante relacionado com as oscilações teta (DIEKELMANN; BORN, 2010; ALMEIDA-FILHO; QUEIROZ; RIBEIRO, 2018; GIRARDEAU; SANTOS, 2021), que são observáveis facilmente no registro do potencial de campo local (LFP, do inglês, *local field potential*) do hipocampo durante esse estado. Em humanos, a atividade de teta foi aumentada durante o sono REM subsequente a uma tarefa de memorização de pares de palavras (FOGEL; SMITH; COTE, 2007). Além disso, a atividade de teta no córtex pré-frontal direito, exclusivamente, está relacionada com a consolidação de memórias emocionais (NISHIDA et al., 2009). Os achados de Popa et al. (2010) em ratos mostram que a coordenação entre a amígdala, o mPFC e o hipocampo mediada por teta durante REM pode influenciar na consolidação de memória aversiva.

Um importante estudo que evidencia o papel causal de teta na consolidação de memória durante o sono REM foi o realizado por Boyce et al. (2016). Os autores silenciaram a atividade de neurônios liberadores de GABA (ácido gama-aminobutírico) do septo medial (SM) por meio de inibição optogenética. Tais neurônios atuam na geração das oscilações teta no hipocampo durante o sono REM. Logo após a execução de uma tarefa de exploração espacial, os neurônios SM-GABA de camundongos foram inibidos durante REM no sono subsequente, reduzindo a atividade de teta nesse período. Como resultado, essa redução esteve associada com um prejuízo na consolidação das memórias de reconhecimento espacial de objetos e contextual aversiva.

Alguns achados ampliam a associação de teta com fenômenos de reativação e mecanismos de plasticidade que parecem dar sustentação à consolidação durante REM (DIEKELMANN; BORN, 2010). Por exemplo, a reativação de *place cells* que codificam um ambiente familiar foi registrada preferencialmente durante o vale das oscilações teta no sono REM após a exploração (POE et al., 2000). Já as *place cells* que codificam lugares

inéditos exibiram disparos durante os picos das ondas teta. Além disso, já foi demonstrado que a indução de LTP na região de CA1 do hipocampo depende da fase de teta em que os pulsos são aplicados (HÖLSCHER; ANWYL; ROWAN, 1997). Em conjunto, essas evidências são consistentes com a ideia de que no sono REM há um mecanismo de seleção, coordenado pelas oscilações teta, que promove o fortalecimento sináptico de circuitos que codificam novos episódios e o enfraquecimento de redes que codificam eventos familiares (DIEKELMANN; BORN, 2010).

Atualmente é reforçada a hipótese de que ambos os estágios do sono são importantes para a consolidação das memórias declarativas, sendo que a alternância entre eles promove, de maneira conjunta, um estabelecimento gradual e adequado da memória nas regiões corticais (GIUDITTA et al., 1995; RASCH; BORN, 2013; GIUDITTA, 2014). Tal hipótese, conhecida como “hipótese sequencial do sono”, foi inicialmente proposta por Giuditta em 1995 e vem agregando evidências a seu favor desde então (SARA, 2017).

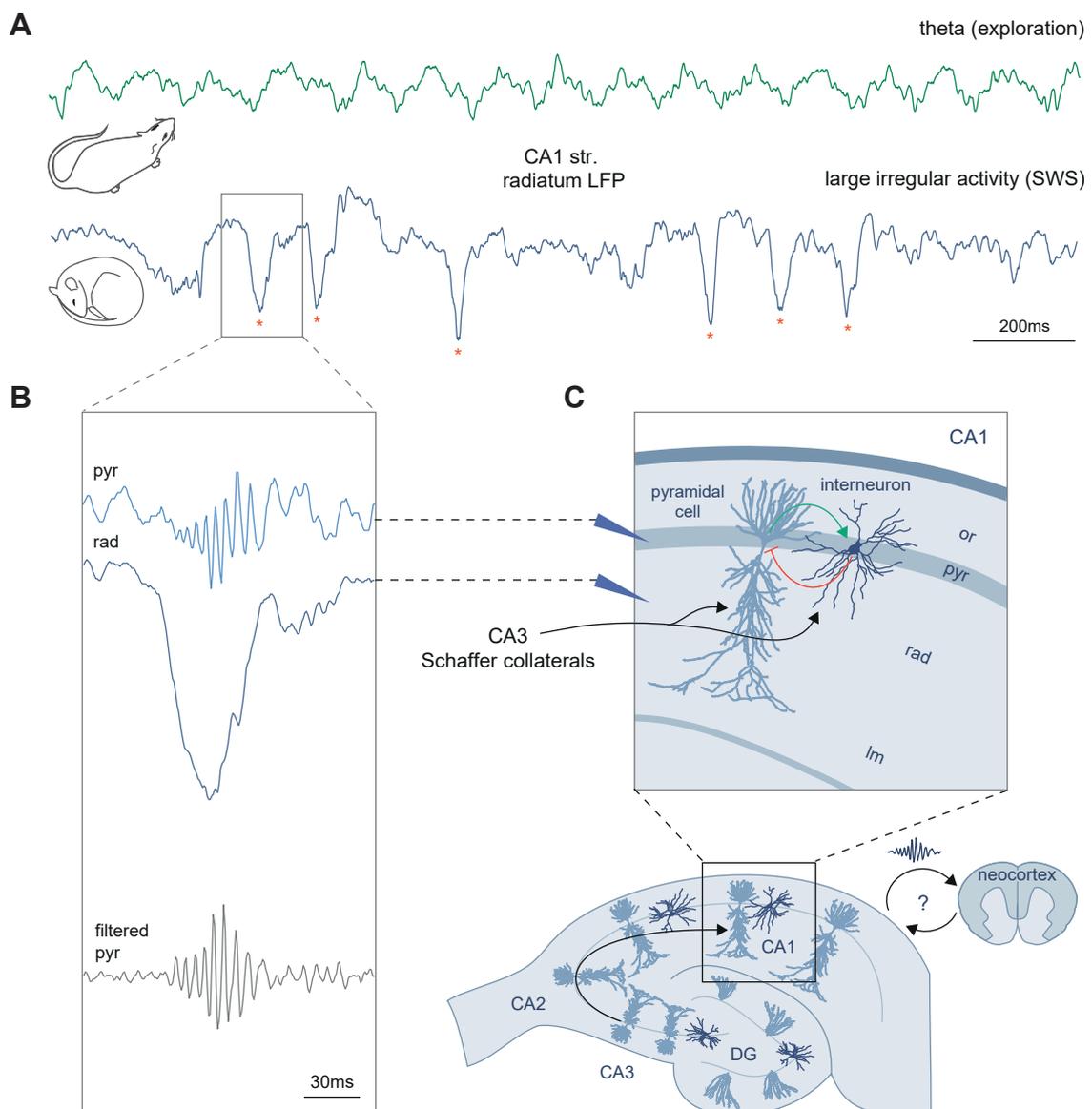
## 1.6 *Sharp wave-ripples*

O que estaria por trás da coordenação e geração dos *replays*, favorecendo a estabilização e a integração das representações de memória em circuitos corticais, são atividades neuronais marcadas por padrões oscilatórios de alta frequência denominados *sharp wave-ripples* (SWRs) (SADOWSKI; JONES; MELLOR, 2016). As SWRs são registradas extracelularmente na região de CA1, do hipocampo, e ocorrem principalmente durante o sono NREM e em períodos de comportamento não exploratório durante a vigília (BUZSÁKI, 2015). Tais eventos oscilatórios apresentam componentes de frequência na faixa de 100 a 250 Hz e duração entre 50 e 150 ms (BUZSÁKI, 2015; DUTTA; ACKERMANN; KEMERE, 2019; FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2019). Segundo alguns autores, a frequência intrínseca das *ripples* parece ser ideal para gerar modificações sinápticas via mecanismos de LTP ou de plasticidade sináptica dependente do tempo de disparo (STDP, do inglês, *spike timing-dependent plasticity*) (GIRARDEAU; ZUGARO, 2011).

As SWRs são geradas localmente nos circuitos hipocampais, mas rapidamente se propagam para regiões-alvo do hipocampo em estruturas corticais e subcorticais (PRIDA, 2020). Elas constituem um complexo oscilatório formado por dois eventos distintos, mas relacionados: as *sharp waves* e as *ripples* (Figura 6). A despolarização não-rítmica de uma fração significativa de neurônios de CA3 atinge células piramidais de CA1 no stratum radiatum via colateral de Schaffer, resultando nas *sharp-waves*. Como consequência, interneurônios de CA1 são também recrutados e passam a responder de forma síncrona e em alta frequência. A interação entre interneurônios e neurônios excitatórios na camada piramidal de CA1 resulta em oscilações de campo na faixa de 100-250 Hz, denominadas *ripples* (GIRARDEAU; ZUGARO, 2011). As SWRs acontecem simultaneamente nos dois hemisférios do cérebro, mas não necessariamente sincronizadas em fase (YLINEN et al.,

1995).

Figura 6 – LFP do hipocampo e registro de *sharp wave-ripples*. **(A)** Durante períodos de exploração, a oscilação teta ( $\sim 4-10$  Hz) predomina no LFP do hipocampo. Já em momentos de sono ou de baixa atividade durante a vigília, são registrados eventos de *sharp-wave* no stratum radiatum de CA1. **(B)** Oscilações de alta frequência (100-250 Hz) denominadas *ripples* ocorrem na camada piramidal de CA1 simultaneamente às *sharp-waves*. **(C)** O complexo oscilatório que constitui as SWRs se inicia com uma despolarização dos neurônios piramidais de CA3, que se propaga até CA1 via colateral de Schaffer e atinge as ramificações dendríticas de neurônios piramidais na camada do stratum radiatum. A ativação concomitante de interneurônios de CA1 e a interação com os neurônios piramidais geram as *ripples*. pyr = stratum pyramidale; or = stratum oriens; rad = stratum radiatum; lm = stratum lacunosum moleculare; DG = giro denteado.



Fonte: adaptada de Girardeau e Zugaro (2011).

A noção de que as SWRs atuam na coordenação do *replay* começou no fim do século

passado, quando um experimento analisou a atividade de *place cells* durante SWRs em períodos de sono NREM antes e após uma tarefa de exploração ambiental (BUZSÁKI, 2015). Os neurônios mais ativos na vigília foram os que mais consistentemente dispararam durante SWRs no sono subsequente, mesmo que tenham apresentado baixa atividade no sono antes da exploração ambiental. Em seguida, foi demonstrado que *place cells* com sobreposição de *place fields*, cujas atividades eram fortemente correlacionadas durante a exploração, tiveram um aumento significativo de ativação conjunta durante SWRs no sono subsequente (WILSON; MCNAUGHTON, 1994). Essas observações foram ampliadas com a descoberta de que a sequência temporal dessa atividade correlacionada durante a vigília é preservada durante as SWRs (SKAGGS; MCNAUGHTON, 1996). Tais evidências estabeleceram os fundamentos do fenômeno de *replay* e de sua relação com as SWRs (para uma revisão mais detalhada, ver Buzsáki (2015)).

O primeiro trabalho a demonstrar o efeito causal da supressão de *ripples* na consolidação de memória foi o de Girardeau et al. (2009). Em um experimento com ratos Long Evans, os autores suprimiram as SWRs durante o sono NREM após uma tarefa de aprendizado espacial no labirinto radial. Tal supressão foi feita por meio da aplicação de um estímulo elétrico na comissura do hipocampo ventral (VHC, do inglês, *ventral hippocampal commissure*). Em comparação com animais que receberam o estímulo atrasado mediante a detecção das *ripples*, o grupo submetido à perturbação de SWRs apresentou um desempenho reduzido ao longo dos dias de teste. Na conclusão do trabalho, os autores sugerem que “as SWRs são críticas para a consolidação de memória possivelmente porque, por comprimir temporalmente as reativações de sequências de disparos da vigília no hipocampo, elas permitem que os potenciais de ação ocorram em uma janela de tempo compatível com a ativação de receptores NMDA e com a STDP”<sup>1</sup>. Experimentos posteriores de perturbação das SWRs durante o sono reforçam os achados de Girardeau et al. (2009), evidenciando prejuízos na formação de memórias espaciais e também sociais (EGO-STENGEL; WILSON, 2010; NORIMOTO et al., 2018; OLIVA et al., 2020; ALEMAN-ZAPATA; MORRIS; GENZEL, 2022).

No começo das investigações sobre o fenômeno de *replay*, acreditava-se que ele ocorria preferencialmente na primeira hora de sono após a exploração (KUDRIMOTI; BARNES; MCNAUGHTON, 1999). É por essa razão que a maior parte dos experimentos de interrupção de SWRs limitou a intervenção a uma janela breve de tempo, ignorando períodos tardios do sono (FINDLAY; TONONI; CIRELLI, 2020). No entanto, um trabalho mais recente mostra que os *replays* ocorrem por até 10 horas durante o sono após uma experiência nova (GIRI et al., 2019). Giri et al. (2019) mostram que a ausência do fator “novidade” leva a resultados similares aos encontrados nos primeiros trabalhos, os quais

<sup>1</sup> “[...] SPW-Rs are critical for memory consolidation, possibly because, by temporally compressing reactivations of waking firing sequences in the hippocampus, they allow spikes to occur in a time window that is compatible with activation of the NMDA receptors and spike timing-dependent plasticity.”

avaliaram o *replay* em ambiente familiar. Os dados indicam que a novidade é um elemento modulador da ocorrência sustentada de *replays* durante o sono.

### 1.6.1 SWRs sincronizadas com eventos corticais delta e *spindle*

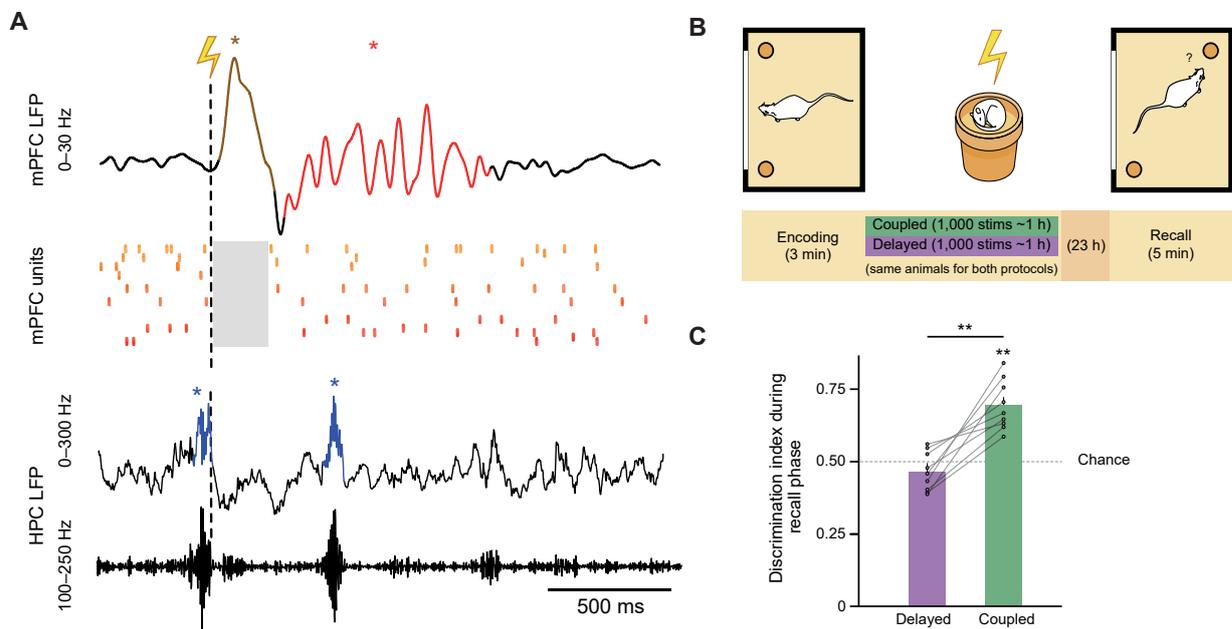
Trabalhos mais recentes sugerem que as SWRs atuam em sincronia com atividades oscilatórias corticais e talâmicas para estabelecer uma comunicação entre áreas que promova a consolidação de memórias (STARESINA et al., 2015; MAINGRET et al., 2016; LATCHOUMANE et al., 2017; HELFRICH et al., 2019). Particularmente, o trabalho de Maingret et al. (2016) mostra, de forma bastante elegante, que a coordenação entre SWRs no hipocampo, ondas delta (0,1 a 4 Hz) no córtex pré-frontal medial e *spindles* tálamo-corticais (10 a 20 Hz) seja importante para a mediação dos processos de consolidação de memórias espaciais.

No experimento elaborado pelos autores (Figura 7), ratos Long Evans executaram uma tarefa de localização espacial de objetos. Os animais foram divididos em dois grupos, que se diferenciavam quanto ao tempo disponível para exploração da arena durante a aquisição (3 e 20 minutos). Na etapa de evocação, realizada 24 horas depois, os animais que tiveram mais tempo para explorar o ambiente foram capazes de discriminar a localização dos objetos, indicando formação de memória espacial. Além disso, eles apresentaram uma ocorrência conjunta aumentada de SWRs seguidas por deltas e *spindles* no mPFC durante o sono NREM pós-aquisição. Os animais do outro grupo, cuja etapa de aquisição foi mais curta, não discriminaram a posição dos objetos nem apresentaram alterações nas taxas basais de ocorrência conjunta dos eventos mencionados.

Inspirados por esses resultados, Maingret et al. (2016) fizeram um experimento posterior que consistia em induzir, com estimulação elétrica, o aumento de delta e *spindle* corticais logo após a detecção de SWRs. Durante o sono NREM precedido por uma sessão de aquisição de 3 minutos, eventos de delta e *spindle* foram induzidos em sincronia (acoplados) com as SWRs ou em atraso (desacoplados). Surpreendentemente, e em concordância com as observações do experimento anterior, os animais passaram a discriminar os dois objetos quando o estímulo foi aplicado em sincronia com as SWRs, mas não quando as oscilações corticais foram induzidas fora da janela de tempo adequada (Figura 7C). Esses resultados evidenciam a importância de uma sintonia temporal fina entre os eventos hipocámpais e corticais para a consolidação de memórias espaciais.

Seria o acoplamento temporal entre SWR, delta e *spindle* uma janela de oportunidade para a consolidação de memórias declarativas? A coordenação sequencial e temporalmente organizada desses eventos é que proveria, durante o sono, as condições adequadas para os processos de plasticidade subjacentes à distribuição, estabilização e integração das representações de memória em redes corticais? Os experimentos de interrupção de *ripples* no hipocampo mostram que a supressão de um dos interlocutores nessa comunicação

Figura 7 – A indução de delta e spindle no mPFC após SWRs potencializa a consolidação de memória espacial. **(A)** Exemplo de registros de SWRs no hipocampo (eventos em azul), além de delta (amarelo) e *spindle* (vermelho) induzidas no mPFC a partir da estimulação elétrica do córtex motor. As ondas delta representam momentos de silêncio da rede cortical, conforme indicam os registros unitários. **(B)** Durante o sono após a etapa de aquisição da tarefa de localização espacial de objetos, o estímulo elétrico foi aplicado ou em sincronia com as SWRs, ou com atraso em relação a elas. No dia seguinte foi realizada a etapa de evocação, quando o animal é novamente exposto à arena, mas com um dos objetos deslocado de sua posição original. **(C)** Na etapa de evocação, o desempenho na tarefa é quantificado pelo índice de discriminação, que mede o tempo relativo de exploração de cada objeto. Quando aplicado em sincronia com as SWRs, o estímulo elétrico foi suficiente para potencializar a consolidação da memória espacial. Estímulos aplicados de maneira não síncrona, que também são capazes de elicitar delta e *spindle*, não geraram efeitos na consolidação.



Fonte: adaptada de Maingret et al. (2016).

prejudica a consolidação de memória. No entanto, quais seriam os efeitos da perturbação específica de regiões corticais durante delta e *spindle*? Ainda não há evidências causais que respondam a essa pergunta.

Uma das formas de se avançar na compreensão dos mecanismos de consolidação por trás do diálogo hipocampo-neocórtex durante o sono seria, por exemplo, dar continuidade ao trabalho de Maingret et al. (2016) e avaliar os efeitos da perturbação do mPFC durante delta e *spindle* precedidas por SWRs. Conforme demonstrado pelos autores, o aumento induzido da ocorrência conjunta desses eventos é suficiente para potencializar a consolidação na tarefa de localização espacial de objetos. Porém, a utilização dessa mesma tarefa para testar o envolvimento causal das redes corticais apresenta alguns problemas.

Em primeiro lugar, os trabalhos de interrupção de *ripples* não observaram um

completo bloqueio da capacidade de formar memórias espaciais (GIRARDEAU et al., 2009; EGO-STENGEL; WILSON, 2010). O que houve, no entanto, foi um desempenho reduzido, que foi sendo evidenciado gradualmente ao longo dos dias de teste. A formação de memória nesses cenários sugere a participação de outros processos de consolidação, até mesmo de caráter compensatório. Portanto, dada a possível atuação desses mecanismos redundantes, é provável que o teste de localização de objetos, por ser realizado em um curto espaço de tempo, não tenha sensibilidade suficiente para detectar efeitos na memória que sejam resultado da intervenção proposta. Em segundo lugar, na tentativa de reproduzir o teste de localização de objetos em nosso laboratório (POLANCZYK, 2023), o desempenho dos animais controle ficou abaixo daquele reportado por Maingret et al. (2016). Mesmo igualando as condições experimentais nos mais variados aspectos (dimensões e características da caixa e dos objetos, iluminação da sala, procedimentos e materiais de higienização entre sessões, etc.), os animais não apresentaram índice de discriminação próximo daquele reportado por Maingret et al. (2016). Novamente, seria pouco provável que os efeitos da perturbação dos eventos corticais fossem notáveis em um cenário de baixo aprendizado do grupo controle. Diante disso, uma tarefa de memória espacial que se apresenta como adequada para investigar o papel do acoplamento triplo SWR-delta-*spindle* é a do labirinto de Barnes.

## 1.7 Avaliação da memória espacial utilizando o labirinto de Barnes

O labirinto de Barnes (BM; do inglês, *Barnes maze*) foi desenvolvido em 1979 como um substituto menos estressor do labirinto aquático de Morris (BARNES, 1979). No BM, os fatores de motivação são a aversão natural dos roedores por espaços abertos, com incidência direta de luz, e a preferência por abrigos de baixa luminosidade. O teste consiste em colocar os animais sobre uma plataforma circular suspensa contendo vários orifícios, dentre os quais apenas um leva a um abrigo do ambiente externo. Com a exposição repetida ao labirinto, espera-se que os animais aprendam a localização do escape e, com o passar das sessões, se direcionem a ele de forma mais rápida e eficiente (PITTS, 2018; GAWEL et al., 2019).

Diversos trabalhos fornecem evidência da participação do hipocampo e do mPFC na resolução do labirinto de Barnes. Como exemplo, em um estudo que analisou a atividade neuronal em diversas regiões do cérebro, Holschneider et al. (2019) reportam um aumento na atividade das regiões CA1, CA3, subículo e mPFC (área pré-límbica) durante a etapa de evocação no BM. Mais recentemente, o trabalho de Beraldo (2024) mostrou que, no primeiro dia de aquisição da tarefa, há um aumento não só na ocorrência isolada de SWRs no hipocampo e de ondas delta no mPFC, mas também na ocorrência conjunta desses eventos no tempo; além disso, um aumento na potência de ondas delta no mPFC, também no primeiro dia, esteve correlacionado com o nível de desempenho na tarefa.

Em termos de plasticidade sináptica, no trabalho de Uriarte, Ogundele e Pardo (2017), os autores observaram um aumento na densidade de espinhas dendríticas em CA1 e no giro denteado de animais que passaram pelo aprendizado no labirinto, indicando a ocorrência de processos de plasticidade no hipocampo. Em contraposição, os resultados do estudo de Sadeghian et al. (2019) não apontaram aumento no potencial excitatório pós-sináptico de campo (fEPSP, do inglês, *field excitatory postsynaptic potential*) em CA1 após aprendizado na tarefa, sugerindo ausência de fortalecimento sináptico. Entretanto, os próprios autores discutem que a medida de fEPSP pode não ser adequada para investigar os possíveis processos de plasticidade relevantes nesse caso, já que as sinapses envolvidas na formação de memória podem ser poucas e estar distribuídas em diferentes neurônios de CA1.

Até os dias atuais, não foram encontrados estudos na literatura que testassem a causalidade dos eventos de SWR, delta ou *spindle* na consolidação de memória espacial durante o sono após a aquisição no labirinto de Barnes. O trabalho mais próximo de apresentar evidências desse tipo foi o de Binder et al. (2019). Os autores usaram optogenética para silenciar, no mPFC e durante o sono NREM, os terminais axonais de projeções oriundas do hipocampo. Tal protocolo resultou em prejuízos de memória recente (24hs), mas não remota (12 dias), além de impedir que os animais empregassem a estratégia mais eficiente na busca pelo escape durante a etapa de treino. A inibição optogenética, no entanto, não se limitou a eventos oscilatórios específicos, mas foi aplicada durante todo o período de sono NREM identificado nas 3 horas de registro pós-aquisição.

## 1.8 Proposta e relevância deste trabalho

Diante do cenário exposto nas últimas seções, a proposta deste trabalho é investigar o papel das SWRs durante o sono na formação de memória espacial. Mais concretamente, pretende-se fornecer evidências sobre os efeitos da perturbação de *ripples* no sono após o aprendizado no BM e, simultaneamente, avançar no estabelecimento de uma infraestrutura que permita, em experimentos futuros, testar a relevância da sincronia entre SWRs, ondas delta e *spindles* para a consolidação de memória. Avaliar a participação conjunta e isolada de tais eventos oscilatórios na comunicação hipocampo-neocórtex é fundamental para melhor compreender os mecanismos subjacentes à consolidação da memória durante o sono.

A necessidade de um entendimento mais claro sobre o papel do sono nos mecanismos de formação da memória tem como elemento motivador a possibilidade de melhorar a vida de pessoas em diferentes condições e contextos. Refinar a compreensão desses mecanismos abre caminhos para o desenvolvimento de fármacos, tratamentos e hábitos que busquem, por exemplo: aumentar o desempenho escolar e laboral; melhorar a qualidade de vida de pacientes com transtornos psiquiátricos; reduzir a quantidade de acidentes

que envolvem trabalhadores noturnos e atuar em variáveis que impactem a capacidade de memória por meio do controle da qualidade do sono, de um modo geral.

Pessoas com depressão grave e narcolepsia, por exemplo, podem ter o sono iniciado pela fase REM, pulando uma etapa inicial de NREM que é comum em indivíduos isentos dessas condições (DALGALARRONDO, 2018). Quais efeitos essa inversão pode gerar na memória e no aprendizado dessas pessoas? Ainda de acordo com Dalgalarrondo (2018), a perda de memória episódica é observada também em indivíduos com Alzheimer, síndrome de Wernicke-Korsakoff, esquizofrenia e Parkinson (PAUSE et al., 2013). Sabendo-se mais claramente sobre os processos de formação de memória, há alguma atuação possível no sono dessas pessoas para que a perda de memória seja amenizada?

Mello (2014), que colheu relatos de 400 motoristas de ônibus interestaduais brasileiros (MELLO et al., 2000), reforça que as características do sono de trabalhadores noturnos resultam, em grande parte das vezes, em prejuízos na capacidade de julgamento, decisão, concentração e memória. Segundo o autor, a redução dessas capacidades, além de contribuir para uma piora na qualidade de vida dessas pessoas, está fortemente associada ao aumento do número de acidentes de trabalho. Um estudo mais detalhado dos processos sono-memória pode fornecer evidências que corroborem políticas e práticas voltadas para a redução desse número.

Nesse contexto, este trabalho de doutorado busca contribuir para a discussão de questões ainda pertinentes nas neurociências básicas, cuja elucidação tem potencial para gerar impactos positivos na saúde e na qualidade de vida das pessoas. Algumas dessas questões são: quão relevante é a comunicação entre hipocampo e córtex durante o sono para a formação de memórias espaciais? Qual o papel das SWRs na consolidação de memórias declarativas e quais os mecanismos de plasticidade envolvidos? De que forma as ondas delta e *spindles* contribuem para a consolidação?

## 2 Objetivos

De maneira geral, a proposta deste trabalho é: 1) preparar uma infraestrutura experimental que permita realizar experimentos de manipulação da circuitaria neural, em malha fechada, a partir da detecção de SWRs; 2) investigar os efeitos da perturbação de SWRs durante o sono subsequente ao aprendizado na tarefa do labirinto de Barnes. Para isso, três objetivos foram estabelecidos e abordados nas seguintes partes do trabalho:

Parte I: desenvolver um detector de SWRs em tempo real integrado ao sistema de registro eletrofisiológico Open Ephys; a detecção deverá ser acurada e em tempo hábil para perturbar tanto SWRs, no hipocampo, quanto a atividade cortical durante eventos associados (i.e. delta e *spindle*);

Parte II: realizar experimentos de perturbação das *ripples* durante o sono após a aquisição no BM e avaliar os possíveis efeitos na formação de memória espacial;

Parte III: estabelecer uma infraestrutura experimental (i.e. padronização das técnicas, do implante intracraniano e montagem da estrutura de *hardware* e *software*) que viabilize a realização de experimentos futuros em malha fechada com optogenética; a partir disso será possível testar os efeitos da inibição seletiva do córtex durante ondas delta e *spindles* precedidas por SWRs.

## Parte I

Desenvolvimento de um *plugin* para detecção  
de *ripples* em tempo real

## 3 I: Introdução

O primeiro passo para viabilizar os experimentos de manipulação da circuitaria neural em malha fechada é estabelecer um sistema capaz de 1) registrar a atividade eletrofisiológica das regiões de interesse, incluindo o hipocampo; 2) detectar as SWRs em tempo real a partir do LFP da região de CA1, do hipocampo, e enviar um comando para acionamento do sistema de estimulação; 3) aplicar a estimulação elétrica ou optogenética na região-alvo em tempo hábil. Uma peça fundamental desse sistema é o módulo dedicado à detecção de SWRs e ao acionamento da estimulação, do qual trata esta Parte I do trabalho.

Pensando na realidade dos laboratórios nacionais e nos recursos de *hardware* e *software* comumente disponíveis, decidiu-se por implementar a detecção de *ripples* na interface do próprio equipamento de registro eletrofisiológico utilizado no laboratório: o Open Ephys. Trata-se de um sistema de registro multicanal de código aberto, cuja estrutura modular de software permite a inclusão de blocos funcionais personalizados (SIEGLE et al., 2017). Em detrimento da construção de circuitos elétricos dedicados, por exemplo, são várias as vantagens de se implementar a detecção de *ripples* na forma de um *plugin* já integrado à interface gráfica (GUI, do inglês, *graphical user's interface*) do Open Ephys. Em primeiro lugar, e por apresentar uma interface gráfica simples, o *plugin* é acessível e permite um ajuste fácil dos parâmetros de detecção pelos experimentadores. Em segundo lugar, é flexível o suficiente para permitir a detecção de outros eventos oscilatórios além das SWRs, tais como as descargas epileptiformes interictais (IEDs, do inglês, *interictal epileptiform discharges*). Mas duas outras vantagens se apresentam de maneira mais expressiva: 1) o fato de ser um sistema de código aberto favorece o acesso pela comunidade científica internacional, contribuindo para o aperfeiçoamento coletivo da ferramenta e, de modo mais importante, para a reprodutibilidade dos experimentos e achados científicos; 2) a implementação do detector de SWRs como *plugin* da GUI do Open Ephys favorece consideravelmente a incorporação de um mecanismo integrado e simultâneo de detecção de movimento do animal, importante para reduzir a detecção de falsos eventos e a estimulação em momentos inapropriados.

O desenvolvimento e validação do *plugin* de detecção de SWRs foram publicados em 2022 na revista *Journal of Neural Engineering* (SOUSA et al., 2022). Os códigos do *plugin* também foram disponibilizados para a comunidade científica no mesmo ano ([www.github.com/bmsousa91/RippleDetector](https://www.github.com/bmsousa91/RippleDetector)). A próxima seção contém o texto integral do artigo e, em seguida, é apresentada uma breve discussão complementar contendo algumas atualizações desde a sua publicação.

4 I: Desenvolvimento de um *plugin* para detecção de *ripples* integrado à GUI do Open Ephys



## PAPER

## An open-source, ready-to-use and validated ripple detector plugin for the Open Ephys GUI

RECEIVED  
8 April 2022REVISED  
8 July 2022ACCEPTED FOR PUBLICATION  
29 July 2022PUBLISHED  
12 August 2022Bruno Monteiro de Sousa<sup>1,2,6,\*</sup> , Eliezyer Fermino de Oliveira<sup>3,6</sup> , Ikaro Jesus da Silva Beraldo<sup>1,2</sup> ,  
Rafaela Schuttenberg Polanczyk<sup>1,2</sup> , João Pereira Leite<sup>4</sup>  and Cleiton Lopes Aguiar<sup>2,5,\*</sup> <sup>1</sup> Graduate Program in Biological Sciences: Physiology and Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil<sup>2</sup> Laboratory of Molecular and Behavioral Neuroscience (LANEC), Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil<sup>3</sup> Dominick P Purpura Department of Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, United States of America<sup>4</sup> Department of Neuroscience and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil<sup>5</sup> Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil<sup>6</sup> Contributed equally to this work.

\* Authors to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: [b-sousa@ufmg.br](mailto:b-sousa@ufmg.br) and [cleitonufmg@gmail.com](mailto:cleitonufmg@gmail.com)**Keywords:** sharp wave-ripple, closed-loop, Open Ephys, open-sourceSupplementary material for this article is available [online](#)**Abstract**

**Objective.** Sharp wave-ripples (SWRs, 100–250 Hz) are oscillatory events extracellularly recorded in the CA1 subfield of the hippocampus during sleep and quiet wakefulness. Many studies employed closed-loop strategies to either detect and abolish SWRs within the hippocampus or manipulate other relevant areas upon ripple detection. However, the code and schematics necessary to replicate the detection system are not always available, which hinders the reproducibility of experiments among different research groups. Furthermore, information about performance is not usually reported. Here, we sought to provide an open-source, validated ripple detector for the scientific community. **Approach.** We developed and validated a ripple detection plugin integrated into the Open Ephys graphical user's interface. It contains a built-in movement detector based on accelerometer or electromyogram data that prevents false ripple events (due to chewing, grooming, or moving, for instance) from triggering the stimulation/manipulation device. **Main results.** To determine the accuracy of the detection algorithm, we first carried out simulations in MATLAB with real ripple recordings. Using a specific combination of detection parameters (amplitude threshold of 5 standard deviations above the mean, time threshold of 10 ms, and root mean square block size of 7 samples), we obtained a 97% true positive rate and 2.48 false positives per minute. Next, an Open Ephys plugin based on the same detection algorithm was developed, and a closed-loop system was set up to evaluate the round trip (ripple onset-to-stimulation) latency over synthetic data. The lowest latency obtained was  $34.5 \pm 0.5$  ms. The embedded movement monitoring was effective in reducing false positives and the plugin's flexibility to detect pathological events was also verified. **Significance.** Besides contributing to increased reproducibility, we anticipate that the developed ripple detector plugin will be helpful for many closed-loop applications in the field of systems neuroscience.

**1. Introduction**

Sharp wave-ripples—electrophysiological oscillations in the local field potential (LFP) of the hippocampal CA1 region—are thought to coordinate the repetitive reactivation of memory-related

ensembles and contribute to the integration and stabilization of memory representations (Buzsáki 2015). Regarding their oscillatory features, most SWR events last from 50 to 150 ms, and their frequency components are within the 100–250 Hz range (Csicsvari *et al* 1999, Buzsáki 2015, Adamantidis *et al*

2019, Dutta *et al* 2019, Fernández-Ruiz *et al* 2019). Studies that investigate the causal link between SWRs, learning, and memory consolidation during sleep have usually employed closed-loop, real-time ripple disruption experiments using electrical stimulation (Girardeau *et al* 2009, Ego-Stengel and Wilson 2010, Maignret *et al* 2016) or, more recently, optogenetic techniques (Kovács *et al* 2016, Norimoto *et al* 2018, Oliva *et al* 2020). Closed-loop strategies have also been used to disrupt SWRs during quiet wakefulness, a period in which the awake animal presents slow movement or immobility (Jadhav *et al* 2012, Roux *et al* 2017). The module responsible for the real-time ripple detection is often contained within proprietary, dedicated hardware (table 1). Additionally, the detailed schematics and source code necessary to build a similar detection setup are rarely readily available. This makes it difficult to reproduce results obtained across different laboratories.

It is also worth mentioning that not all studies report the accuracy and latency of ripple detection (table 1). If the reason is the non-execution of prior performance tests, investigators may be inadvertently applying an excess stimulation due to more false-positive events. In some cases, closed-source solutions may limit the feasibility of tests to evaluate the effects produced by variations in the detection parameters, and make it challenging to execute a system-level analysis of the detection performance. Therefore, the trade-offs between performance and over-stimulation side-effects, such as tissue damage, seizures, and plasticity induction, may not be fully understood and controlled by the investigator (Dutta *et al* 2019).

Valuable efforts have been applied to provide a real-time ripple detector whose closed-loop, system-level performance is known so that investigators can be aware of the limitations and possibilities offered by such a tool (Dutta *et al* 2019). Nevertheless, the scientific community still lacks open-source, publicly available ripple detection modules already integrated with widely used electrophysiological recording platforms. Additionally, the increasingly common long-lasting recordings *in vivo* demand built-in, automatic strategies capable of restricting ripple-triggered experimental interventions only to periods of low movement (including sleep and quiet wakefulness), when ripple events are most likely to occur. Movement artifacts during the active phase of rats and mice, for instance, occur frequently and can result in unspecific stimulation, interfering with the experimental protocol. Although most of the closed-loop studies on SWRs carry out interventions only during the initial periods of sleep (Kudrimoti *et al* 1999), new evidence shows that associated replay activity occurs over a much longer timespan (Giri *et al* 2019). Moreover, even in experimental protocols in which stimulation is applied only during the first few hours of the post-learning sleep, it is expected that the

animal presents periods of wakefulness due to the polyphasic nature of its sleep-wake cycle (Mong and Cusmano 2016).

We developed a ready-to-use, real-time ripple detector plugin for the Open Ephys graphical user's interface (GUI) (Siegle *et al* 2017). The built-in algorithm to detect movement based on electromyogram (EMG) or accelerometer data offers the possibility to prevent ripple events from being detected during periods of high activity, where they are likely to be false alarms. A 3-axis accelerometer is already embedded in many headstage models commonly used in conjunction with the Open Ephys acquisition board; thus, movement detection can be performed without using additional implants or a video tracking apparatus. First, to evaluate the dependence of our algorithm's detection accuracy on multiple combinations of parameters, we conducted an off-line MATLAB (MathWorks) simulation of the plugin over pre-recorded real hippocampal CA1 data (hc-3 dataset; Mizuseki *et al* 2013). Next, to evaluate the round trip (event-to-stimulation) latency, a closed-loop architecture similar to the one used in real-time experiments was arranged. In this case, the living animal (or tissue) is replaced by the synthetic data converted to an audio signal and connected directly to an Intan headstage. This closed-loop structure also made it possible to examine the effects of varying other influencing parameters, i.e. the data buffer length and the number of samples considered in the root mean square (RMS) calculation. To validate the mechanism's functioning that blocks ripple events when movement is detected, we first characterized its operation with accelerometer recordings and then analyzed the reduction of events during periods of activity based on EMG recordings of an implanted rat. To demonstrate that the developed plugin can be easily adapted to detect other neural events, we conducted the detection of interictal epileptiform discharges (IEDs) in a kindling model of epilepsy. Finally, although the developed plugin does not perform multichannel ripple detection, various instances of the module can be combined to build a multichannel logic that results in reduced false-positive rates.

## 2. Methods

### 2.1. Implementation of the detection algorithm

The ripple detector was implemented in C++ as a plugin for the Open Ephys GUI v0.5.5 (figure 1(a)). We used the Microsoft Visual Studio 2019 platform to develop and debug the code. Researchers interested in using the ripple detector must download the source code and compile the plugin following the instructions available in the Developer Guide section at <https://open-ephys.github.io/guidocs/>. The plugin's source code is publicly available at [www.github.com/bmsousa91/RippleDetector](http://www.github.com/bmsousa91/RippleDetector). The

**Table 1.** Overview of experimental details in studies using closed-loop systems based on ripple detection. For other related information, see Aleman-Zapata *et al* (2021).

Authors	Animal model	SWR recording region	Online ripple detection components	Detection codes/circuits are publicly available?	Graphical interface for adjusting the detection parameters?	Ripple-triggered manipulation	Detection accuracy and round trip latency	Manipulation disabled during wakefulness/movement?
Girardeau <i>et al</i> (2009)	Rats	CA1 pyramidal layer (dorsal hippocampus)	Power1401 acquisition system + Spike2 software (CED)	No	Yes *	Single-pulse commissural electrical stimulation	TPR: $86.0 \pm 1.3\%$ ; stimulation delay < 15 ms *	Yes—disabled manually or when the speed was $> 5 \text{ cm s}^{-1}$ *
Ego-Stengel and Wilson (2010)	Rats	CA1 pyramidal layer	KrohnHite3384 analog filters and FHC Window Discriminator (threshold crossing)	Does not apply	Does not apply	Burst of biphasic electrical pulses on CA1 afferents	Not found	Not found
Jadhav <i>et al</i> (2012)	Rats	CA1 (dorsal hippocampus)	NSpike data acquisition system	No	Not found	Biphasic, single-pulse commissural electrical stimulation	Ripple oscillation terminated within 25 ms of SWR onset	Yes—online speed filter prevented false positive detections during high speed periods (threshold from 5 to $10 \text{ cm s}^{-1}$ )
Nokia <i>et al</i> (2012)	Rabbits	Right hippocampus	Custom-made hardware	Yes	Does not apply	Light pulses from three LEDs placed in front of the rabbit	89% of SWR events identified offline were detected online	No
Stark <i>et al</i> (2014)	Mice/Rats	CA1 pyramidal layer	Programmable Digital Signal Processor RX6 + RPvdsEx (Tucker-Davis Technologies)	No	Not found	Optogenetic manipulations	Median detection lag: 15 ms; range 12–24 ms; median false negative rate, 27%; range: 7%–45%; Bayes error of the classifier: 16% (median; range: 9%–28%)	Not found
de Lavilléon <i>et al</i> (2015)	Mice	CA1 pyramidal layer	Power1401 acquisition system + Spike2 software (CED)	No	Not found	Train of electrical pulses	The authors reported spike sorting performance	Not found
Papale <i>et al</i> (2016)	Rats	CA1 layer (dorsal hippocampus)	NSpike data acquisition system (Jadhav <i>et al</i> 2012)	No	Not found	Biphasic, single-pulse electrical stimulation	Not found	Not found
Novitskaya <i>et al</i> (2016)	Rats	CA1 pyramidal layer (dorsal hippocampus)	Power1401 acquisition system + Spike2 software (CED)	No	Not found	Trains of biphasic electrical pulses	Not found	Not found

(Continued.)

Table 1. (Continued.)

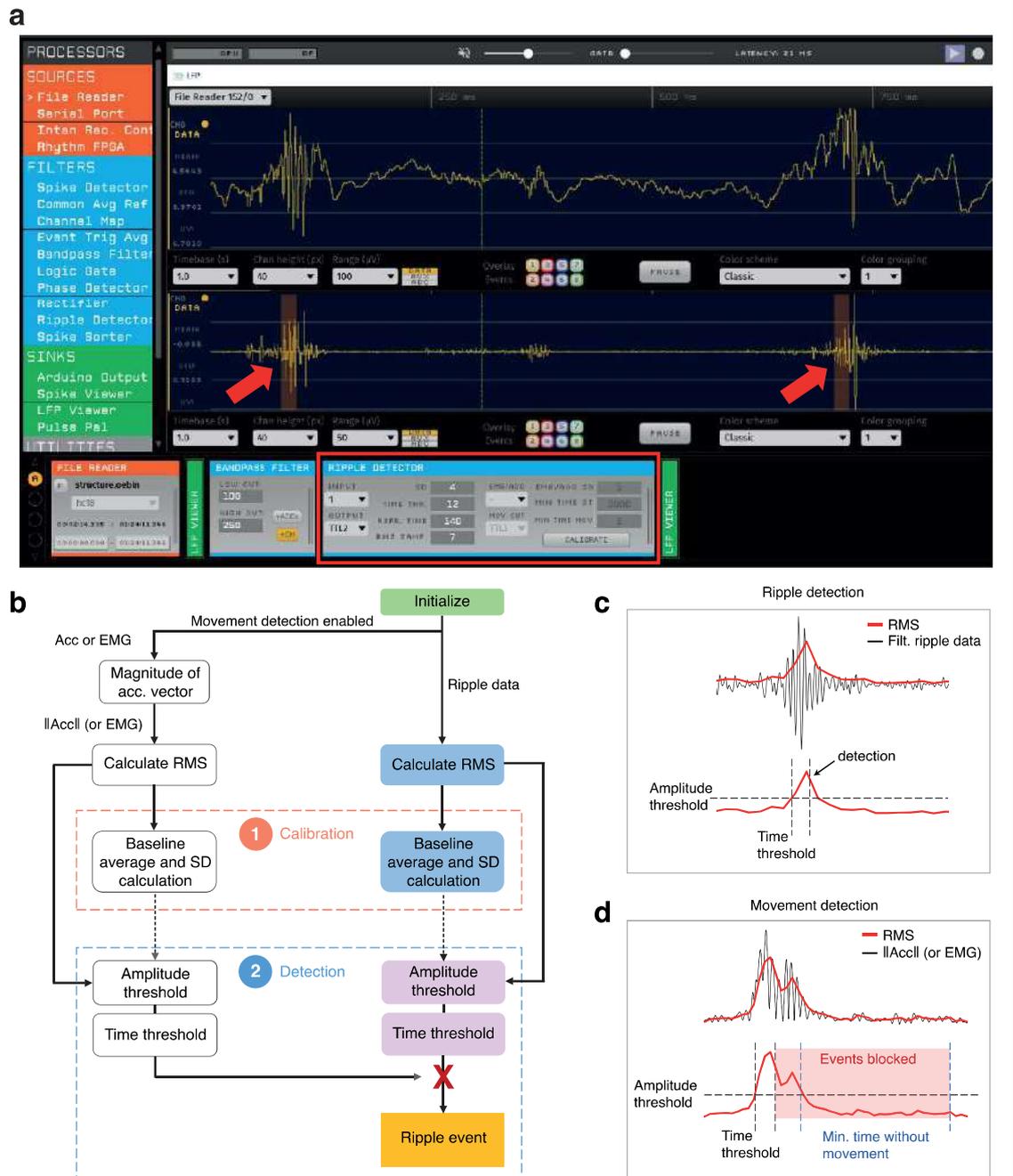
Authors	Animal model	SWR recording region	Online ripple detection components	Detection codes/circuits are publicly available?	Graphical interface for adjusting the detection parameters?	Ripple-triggered manipulation	Detection accuracy and round trip latency	Manipulation disabled during wakefulness/movement?
Maingret <i>et al</i> (2016)	Rats	CA1 pyramidal layer	Power1401 acquisition system + Spike2 software (CED)	No	Yes *	Single-pulse electrical stimulation	Same as Girardeau <i>et al</i> (2009) *	Same as Girardeau <i>et al</i> (2009) *
Kovács <i>et al</i> (2016)	Mice	CA1 pyramidal layer (dorsal hippocampus)	Custom-made hardware (Nokia <i>et al</i> 2012)	Yes	Does not apply	Optogenetic manipulations	Not found	No
Talakoub <i>et al</i> (2016)	Rhesus monkeys ( <i>Macaca mulatta</i> )	CA1/2 and CA3/DG	Programmable Digital Signal Processor HPP (Neuralynx, Inc) + FPGA	No	Not found	Biphasic, single-pulse electrical stimulation	FPR estimate: 12%	No—but artifacts in control electrodes outside the hippocampus blocked ripple detection
van de Ven <i>et al</i> (2016)	Mice	CA1 pyramidal layer (dorsal hippocampus)	Dual-stage amplifier (Sensorium Inc.) + computer with real-time kernel	No	Not found	Optogenetic manipulation	True positive: 80.1% ± 1.0%; Mean Latency: 7.68 ± 0.30 ms before ripple peak power	No—but artifacts in control electrodes outside the hippocampus blocked ripple detection
Roux <i>et al</i> (2017)	Mice	CA1 pyramidal layer (dorsal hippocampus)	Programmable Digital Signal Processor RX6 + RPvdsEx (Tucker-Davis Technologies) (Stark <i>et al</i> 2014)	No	Not found	Optogenetic manipulation	TPR: 83 ± 4%; FPR: 63 ± 4%; Detection latency: median ± SD = 16 ± 20 ms	No
Rangel Guerrero <i>et al</i> (2018)	Mice	CA1 pyramidal layer (dorsal hippocampus)	Custom-made hardware (Nokia <i>et al</i> 2012)	Yes	Does not apply	Optogenetic manipulation	Not found	No
Dutta <i>et al</i> (2019)	Rats	CA1	Open Ephys and SpikeGadgets acquisition systems	Partially (analysis codes available; codes for online detection not identified)	Yes	Digital pulse from a BeagleBone microcontroller	Data acq. latency: 7.5–13.8 ms and 1.35–2.6 ms for USB and ethernet, respectively. Algorithmic latency approx. 20–66 ms, TPR >95% and <10 FP min <sup>-1</sup> , depending on the parameters.	No

(Continued.)

Table 1. (Continued.)

Authors	Animal model	SWR recording region	Online ripple detection components	Detection codes/circuits are publicly available?	Graphical interface for adjusting the detection parameters?	Ripple-triggered manipulation	Detection accuracy and round trip latency	Manipulation disabled during wakefulness/movement?
Norimoto <i>et al</i> (2018)	Mice	CA1 pyramidal layer	Programmable Digital Signal Processor RX6 + RPvdsEx (Tucker-Davis Technologies) (Stark <i>et al</i> 2014)	No	Not found	Optogenetic manipulation	23 ± 12 ms delay for stimulation after ripple onset; FPR: 19.2 ± 1.0%; False negative rate: 2.3 ± 1.8%	No
Michon <i>et al</i> (2019)	Rats	CA1 pyramidal layer	DigiLynx acquisition system + Falcon software	No	Not found	Biphasic electrical stimulation	S3 figure in Michon <i>et al</i> (2019)	No—but hippocampal ripple detections were ignored if they fell around spurious detections in the cortical signals
Fernández-Ruiz <i>et al</i> (2019)	Rats	CA1 pyramidal and stratum radiatum layers	Programmable processor + Spike2 software (CED)	Partially (analysis codes available; codes for online detection not found)	Not found	Optogenetic manipulation	Not found	Yes—ripples detected only during immobility (speed <5 cm s <sup>-1</sup> ) and low-theta power periods
Oliva <i>et al</i> (2020)	Mice	CA2	Programmable processor (CED) + custom-made hardware	No	Not found	Optogenetic manipulation	Not found	No—but artifacts in control electrodes outside the hippocampus blocked ripple detection
Gridchyn <i>et al</i> (2020)	Rats	CA1 pyramidal layer	Data acquisition system (Axona Ltd) + Python software	Yes	No	Optogenetic manipulation	Reaction time (from first spike to LFP deflection caused by the light pulse): 1.04 ms ± 0.09 ms	Not found
Aleman-Zapata <i>et al</i> (2020, Preprint)	Rats	CA1 pyramidal layer	Open Ephys acquisition system + Cython	Yes	Yes	Electrical stimulation	Not found	Not found
Igata <i>et al</i> (2021)	Rats	CA1	Cerebus recording system + custom created C code	No	Not found	Single-pulse electrical stimulation	Not found	Yes—ripples detected only during immobility (speed <5 cm s <sup>-1</sup> )

\* Not found in the manuscript; informed by the authors.



**Figure 1.** Ripple detector plugin for the Open Ephys platform. (a) Through the plugin's graphical interface (highlighted in red), users can adjust the detection parameters. The red arrows indicate detected ripple events. The data shown in this figure were downloaded from the CRCNS website (hc-18 dataset; Drieu *et al* 2018a, 2018b). (b) Step-by-step flowchart of the detection algorithms. Data must be previously filtered in the ripple band. (c) Illustrative example of RMS threshold crossing and ripple detection. Continuous black line: filtered ripple data; red line: RMS envelope of the filtered data; dashed lines: amplitude and time thresholds for ripple detection. (d) Illustrative example of movement detection. Continuous black line: filtered accelerometer or EMG data; red line: RMS envelope; dashed black lines: amplitude and time threshold for movement detection; dashed blue lines: define the minimum period of immobility to restore the plugin's ability to raise detection events. The area in red represents the period in which ripple events are silenced due to motion detection.

synthetic dataset used in section 3.2 and more details on how to use the plugin are available on the same website.

**2.2. Ripple detection algorithm and movement-driven silencing of events**

Real-time detection algorithms must operate with minimal delay while maintaining acceptable accuracy

levels. Furthermore, investigators benefit from a more straightforward detection logic since the effects of adjusting specific parameters are more predictable. Aiming at those features, our ripple detection algorithm was implemented based on the RMS of the filtered signal (figure 1(b)). The ripple detector does not perform any filtering internally and therefore requires that signals are pre-filtered in the ripple

frequency band, which may be achieved by using the built-in Bandpass Filter module (second-order Butterworth filter) in the Open Ephys GUI. The RMS values of the incoming samples provide a rough envelope of the ripple-band filtered data (they can also be thought of as a recurring estimation of the standard deviation if the mean is considered zero). Initially, a calibration period—the first 20 s of recording—defines the baseline, when RMS mean and standard deviation are calculated. Subsequently, RMS values are compared against amplitude and time thresholds during the online detection stage. The amplitude threshold is defined by a fixed number of standard deviations above the mean. RMS values must exceed the amplitude threshold and remain above it for a minimum period—defined as the time threshold—to detect a ripple event (figure 1(c)). The time threshold reduces false detections due to brief periods of RMS augmentation in the ripple frequency band that do not correspond to true ripple oscillation (e.g. artifacts).

The movement detection algorithm (figure 1(b)) is very similar to the ripple detection one. It operates on filtered EMG or accelerometer data to disable ripple events when movement is detected. If the accelerometer is selected to detect movement, the magnitude of the 3D acceleration vector is calculated before the RMS computation. Ripple events are blocked when the RMS values cross the corresponding amplitude and time thresholds. Reactivating detection requires a minimum period of immobility (i.e. a sequence of RMS values below the amplitude threshold) (figure 1(d)).

### 2.3. Synthetic ripple data

Synthetic data was created by adding simulated ripple, fast ripple, and spiky events to a pink noise background signal (figure S1(a)). The corresponding features to simulate those events were extracted from prior characterization studies (Buzsáki *et al* 1992, Bragin *et al* 1999, Nguyen *et al* 2009, Buzsaki 2015). Ripples were represented as pure sinusoidal signals whose frequency distribution followed a Gaussian process with  $\mu = 200$  Hz and  $\sigma = 25$  Hz. Its amplitude was limited by a sinusoidal envelope whose duration was determined by a Gaussian process with  $\mu = 100$  ms and  $\sigma = 25$  ms. The signal-to-noise ratio was around 18 dB. Fast ripples were thought to simulate higher frequency activity in the hippocampus (e.g. seizure onset). They were generated similarly to the ripples but with a shorter duration ( $\mu = 60$  ms;  $\sigma = 15$  ms), higher amplitude, and increased frequency content ( $\mu = 425$  Hz;  $\sigma = 50$  Hz). Finally, artificial spiky events were synthesized as Gaussian curves with high amplitude and low standard deviation ( $\sigma = 0.0003$  ms) to simulate a brief and expressive increase in the ripple-band power. The non-ripple events (fast ripples and spiky events) test the algorithm's ability to reject spurious activities that

contaminate the ripple frequency band correctly. The final duration of the synthetic data was 10 min (30 kHz sampling rate), and one of those three events was injected every 1.5 s, with a likelihood of 33.3% each. There were 400 events: 139 ripples, 124 fast ripples, and 137 spiky events.

### 2.4. Hippocampal CA1 recordings from the hc-3 dataset

To evaluate the plugin's performance over real ripple recordings (section 3.1), pre-recorded hippocampal CA1 data from the hc-3 dataset were downloaded at the CRCNS website (<https://crcns.org/datasets/hc/hc-3>). The hc-3 dataset contains LFP and multiunit recordings from different hippocampal regions of male Long Evans rats (3–8 months old, 250–400 g) while animals performed several tasks (Mizuseki *et al* 2013, 2014). The authors used 4-, 8-, 12- or 16-shank silicon probes, each shank containing eight recording sites ( $160 \mu\text{m}^2$  each site, impedance of 1–3 M $\Omega$ ). Recording sites formed a two-dimensional arrangement and were separated by 20  $\mu\text{m}$  vertically. We considered LFP recordings from the animal ec014, day 42, during the sleep sessions ec014.42.794, ec014.42.796, and ec014.42.798 (figure 2(a)). Data from each sleep section was concatenated to result in a 30 min long single recording (1.25 kHz sampling rate). In all experiments using the hc-3 dataset, the selected recordings were captured from the silicon probe shank 1, channel 8 (indicated by the dataset providers as the shank 1 channel with the most pronounced ripples). To test the multichannel ripple detection strategy (section 3.4), channels 6 and 4 from the same shank were additionally considered.

### 2.5. Prior identification of candidate ripple events

The classification of ripple events in the hc-3 dataset was preceded by a prior identification of candidate ripple events. A modified version of a previously reported detection algorithm was applied (Taxidis *et al* 2015). First, the LFP is bandpass filtered at 100–250 Hz using an FIR filter with a linear phase. The squared values of the filtered LFP are then computed, averaged with a zero-phase FIR filter (order 62), and standardized. Ripple events are initially detected when this standardized power average crosses the threshold of 1 SD (calculated over the entire data). Consecutive events separated by less than 50 ms are merged, and those with a final duration outside the 50–450 ms range are discarded. Finally, only the events with a peak power between 2 and 250 SDs are considered ripple candidates to be further approved or rejected by visual inspection.

### 2.6. Closed-loop setup to measure the round trip delay

To measure the round trip delay—the time from the ripple onset to the stimulation—we set up a closed-loop architecture constituted by an Intan

RHD2132 headstage, the Open Ephys acquisition board (open-ephys.org), a BNC-to-HDMI conversion board, the Pulse Pal device (an open-source pulse generator, [www.sanworks.io](http://www.sanworks.io)), and a computer (Intel i5-8300H, 2.3 GHz, 12 GB RAM) running Windows 10 (figure 4(a)). The synthetic data was converted to a .flac audio file and played directly to an Intan headstage channel via custom-made cable and connectors. The acquisition board receives data from the headstage via SPI cable and streams it to the Open Ephys GUI through a USB 3.0 connection. A processing pipeline in the Open Ephys GUI was built to filter the incoming data in the 100–250 Hz frequency range before supplying it to the ripple detector plugin. Additional plugins were inserted into the processing chain to record (Record Node) and visualize (LFP Viewer) the data, as well as to communicate with the Pulse Pal hardware (Pulse Pal). The detected events trigger the Pulse Pal module, generating a brief digital pulse (single 5 V monophasic pulse, 100  $\mu$ s duration) sent back to the Open Ephys acquisition board. The synthetic signal captured by the headstage, the moments of ripple detection, and the digital pulses generated by Pulse Pal were logged to compute the round trip delay.

### 2.7. Accelerometer data

The 3-axis accelerometer data used to validate the mechanism that silences ripple events after detecting movement was obtained from a public database available at the [buzsakilab.nyumc.org/datasets/](http://buzsakilab.nyumc.org/datasets/) website (Petersen *et al* 2020). We selected the TingleyD dataset (Tingley and Buzsáki 2018), folder D12, session DT12\_4032um\_2232um\_190806\_090411. The accelerometer data segment was extracted from the auxiliary.dat file.

### 2.8. TPR and FPR

Three indices were calculated to characterize the detection performance: TPR, FPR, and round trip latency. For both the synthetic and pre-recorded real data, the TPR for a particular set of parameters (e.g. amplitude and time thresholds, RMS block size, buffer length) is given by the fraction between the sum of ripple events correctly detected and the total number of events previously classified as ripples (equation (1)). In particular, a detection event is considered in the TPR computation when it occurs during the time window that defines the ripple duration. For the synthetic data, the duration of each ripple is intrinsically known since the simulation of the corresponding event was produced under previously established conditions. Regarding the real data, the time window that constitutes the boundaries of a ripple activity was defined during the prior classification of candidate events. In other words, for un-merged ripples, the duration corresponds to the period in which the power average is above the 1 SD threshold (section 2.5). For merged events, the

duration comprises the onset of the earlier event and the end of the latter. Two or more consecutive detections of the same ripple event were considered once for the TPR calculation. The FPR was computed as the sum of the detection events in a non-ripple period divided by the total recording duration in minutes (equation (2)). We opted to provide the FPR as the number of false detections per unit of time because the determination of a denominator that represents the total number of false events (false ground events), albeit it could be defined according to some criteria, may generate a tricky, barely tangible result when the outputs of different experiments are compared.

$$\text{TPR [\%]} = \frac{\text{Total of ripple events detected}}{\text{Total of ripple events}} \times 100\%, \quad (1)$$

$$\text{FPR [events/min]} = \frac{\text{Total of non-ripple events detected}}{\text{Total recording duration (min)}}. \quad (2)$$

### 2.9. Interictal epileptiform discharges and ripples dataset from a kindling experiment

To examine the performance of our plugin for the detection of pathological events (section 3.5), we used a different dataset from a kindling experiment performed in adult male Wistar rats (Zacharias 2019). The experiments were carried out at the Prof. Dr João Pereira Leite's laboratory, University of São Paulo (USP), Brazil. All protocols were approved by the Committee on Animal Research and Ethics of the Medicine School of Ribeirão Preto, USP. In short, the animals were anesthetized with ketamine (100 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and xylazine (10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and tungsten monopolar electrodes were chronically implanted for LFP recordings in the medial prefrontal cortex (mPFC) and in the CA1 subfield of the hippocampus. Additionally, a tungsten electrode was positioned on the nuchal muscle for EMG recording and movement monitoring. A bipolar electrode was implanted into the basolateral amygdala for electrical stimulation (kindling induction). One week after the surgical procedure, the animals were habituated to the experimental box for three consecutive days. On the fourth day, the animals were connected to the data acquisition system and the baseline LFP recordings were performed for 6 h. The kindling protocol was performed in the next three days, which consisted in the delivery of 10 trains of pulses (10 s duration, at 50 Hz) every 20 min. Kindling sessions were performed in the morning (09:00 AM) and lasted around 3 h. LFP signals were continuously recorded before, during and after the kindling sessions. The emergence of IEDs usually occurred from the second day of kindling. For this study, we used the CA1 LFP signal recorded between the second and third kindling sessions from an experimental (kindled) rat (animal ID: R2). LFP signals were filtered and pre-amplified (0.1–1000 Hz, gain 1000x, A-M Systems 3600) before

being digitized at 4 kHz (PowerLab 16/30). Electrical stimuli to induce kindling were applied using the S88X stimulator (Grass Instruments, EUA) with biphasic pulses.

### 2.10. Dataset with EMG recordings

To validate the mechanism that prevents ripple detection based on movement monitoring (section 3.3, figure 6), we used hippocampal and EMG recordings of freely behaving adult male Wistar rats. The recordings were carried out at the Prof. Dr Cleiton Lopes Aguiar's laboratory, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil. All protocols were approved by the Committee on Animal Research and Ethics of UFMG. In short, the animals were anesthetized with ketamine (100 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and xylazine (50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) and tungsten monopolar electrodes were chronically implanted for LFP recordings in the mPFC and in the CA1 subfield of the hippocampus. Additionally, a tungsten electrode was positioned on the nuchal muscle for EMG recording and movement monitoring. One week after the surgical procedure, animals were habituated to the recording arena (an acrylic box) for three consecutive days before the beginning of the recording session. On the fourth day, the animals were connected to the acquisition system and LFP recordings were performed for 9 h (from 8:00 AM to 5:00 PM). Animals were maintained in a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 AM) and had access to water and food ad libitum. For this study, we used the CA1 LFP, the mPFC LFP and the EMG signals recorded during the first 4 h (animal ID: R23). The electrophysiological signals were filtered and pre-amplified (0.1–1000 Hz, gain 1000×, A-M Systems 3600) before being digitized at 4 kHz (PowerLab 16/30).

### 2.11. Brain states classification

To classify the brain states of the animal, we first divided the CA1, mPFC and EMG recordings into 10 s epochs. A visual classification of 40 randomly chosen epochs was carried out by experts. Epochs in which the animal was classified as awake were those that presented increased EMG activity, as well as an increase in the power of the CA1 LFP theta band (5–9 Hz) and in the power of oscillations above 20 Hz in the mPFC. Epochs classified as NREM sleep were defined by low EMG activity and high power in the mPFC delta band (1–4 Hz). REM sleep was identified when low EMG activity occurred simultaneously to high hippocampal theta band power. Finally, epochs in which it was not possible to clearly define a state were classified as N/I (not identified).

The epochs classified according to the criteria aforementioned served as reference for an automatic classification of the remaining epochs based on the Gaussian Mixture Model (GMM) algorithm. The GMM operates with the theta/delta ratio calculated from the hippocampal LFP and with the EMG

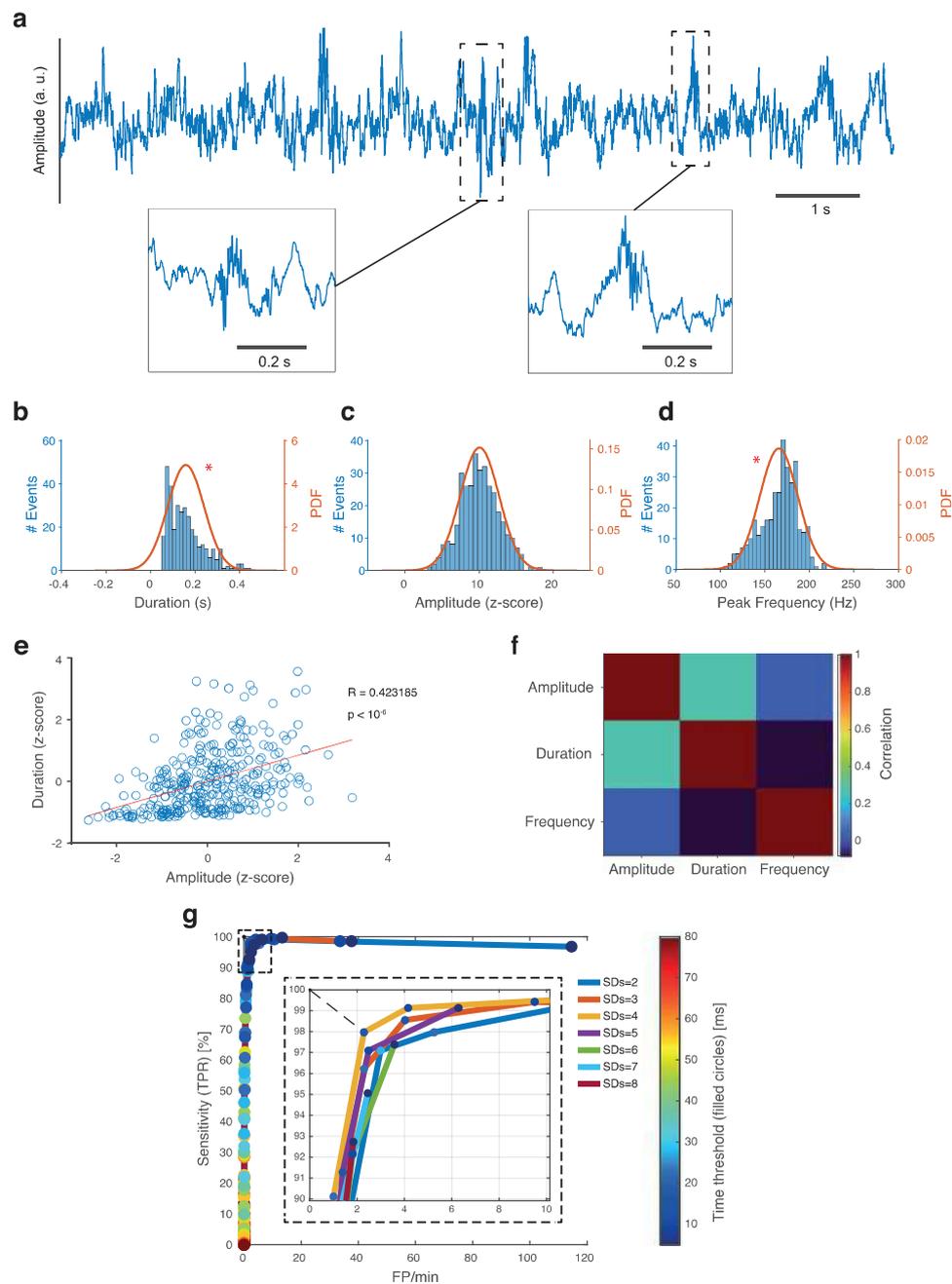
RMS to define the probability distribution of each 10 s epoch to be included in three different data clusters. Each cluster represents a brain state: awake, NREM or REM. Finally, representative epochs of the three clusters were visually inspected to determine *a posteriori* probability threshold for labeling the remaining epochs.

## 3. Results

The ripple detector module contains a straightforward, user-friendly graphical interface (figure 1(a)) that allows investigators to select the input and output channels, adjust the detection thresholds and set a few more detection parameters, such as the number of samples for RMS calculation and the refractory time (period after detection during which new events are blocked). The refractory time is particularly important to avoid redundant output events during long ripples. By clicking the 'Calibrate' button in the GUI, investigators can redefine the detection threshold by recalculating the baseline mean and standard deviation. Additionally, the embedded movement detector prevents ripple events from being raised when the animal is most active, reducing inappropriate stimulation due to movement artifacts. Because the ripple detector module is open-source, users with sufficient programming skills in C++ can modify the original source code to add new features and address specific requirements of their research.

### 3.1. Offline simulation in MATLAB with real data

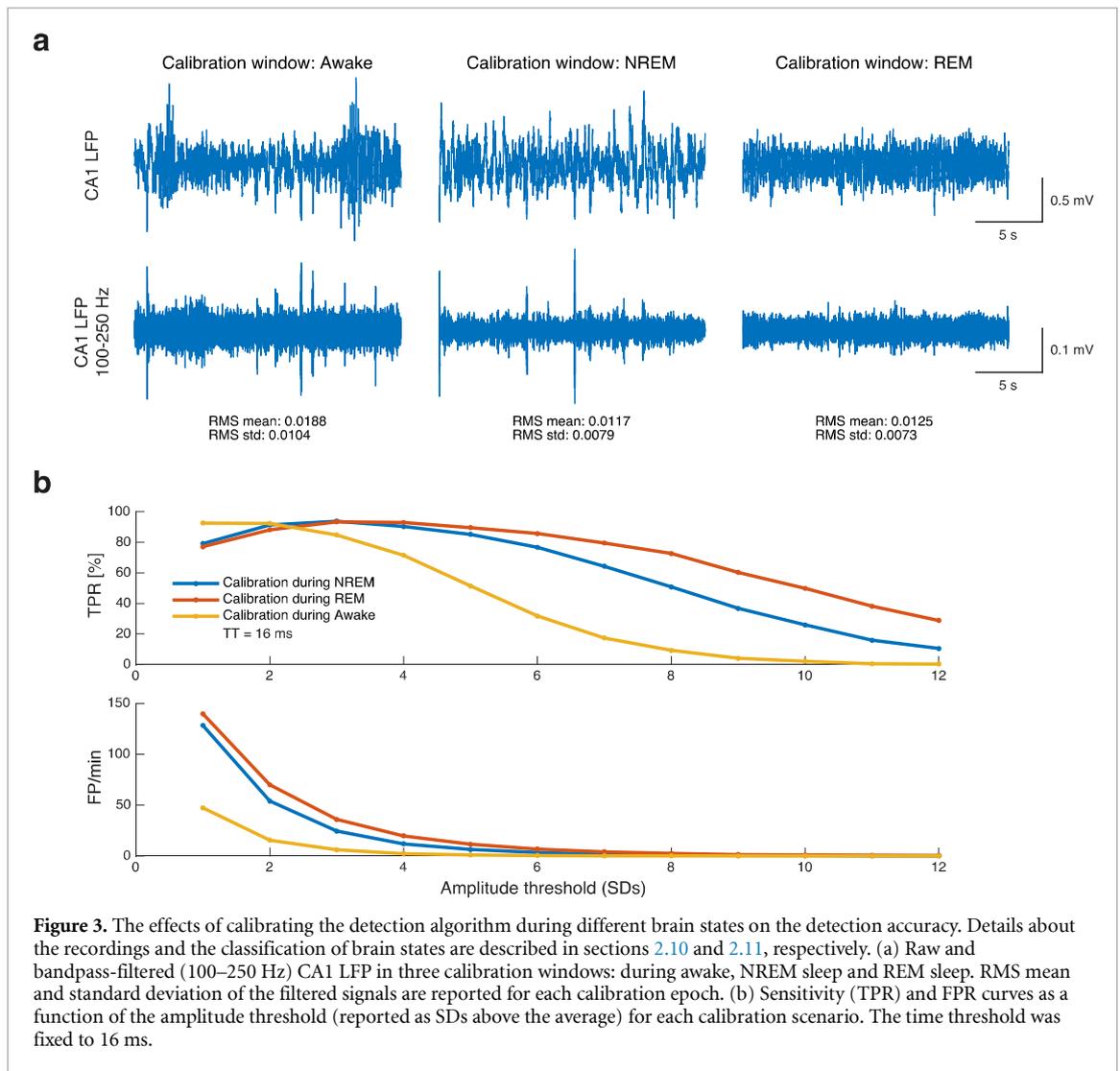
Initially, we verified the accuracy of the detection algorithm over synthetic ripple data and obtained satisfactory detection rates (100% TPR and 0.1 FP min<sup>-1</sup> for a specific combination of thresholds, for example; figure S1). However, although synthetic data provide a reasonable idea about the plugin's behavior and performance, it is essential to validate the detection algorithm over real ripple recordings. Distinct ripple events share common oscillatory features, but they are heterogeneous in duration, power, shape, frequency range, and frequency distribution (Nguyen *et al* 2009, Fernandez-Ruiz *et al* 2019). This heterogeneity may represent a challenge for detection algorithms. We downloaded a dataset publicly available on the CRCNS website that contains real hippocampus recordings from a Long-Evans rat to test the plugin's detection (hc-3 dataset). LFP data from the superficial layer (stratum oriens) of the CA1 hippocampal region was selected from a period when the animal was asleep. To label the ripple events for TPR calculation, we first ran a prior detection algorithm based on previous work (Taxidis *et al* 2015). After this initial ripple identification, experts visually inspected and curated each candidate event to guarantee that no spurious oscillation (e.g. movement or chewing artifacts) would be classified as a



**Figure 2.** Characterization of real, pre-recorded ripple data (hc-3 dataset) and corresponding ROC curves for offline simulations of the plugin in MATLAB. (a) Example of an LFP segment. Two real ripple events are highlighted. (b) Duration of ripple events ( $n = 345$  events, Kolmogorov–Smirnov normality test, null hypothesis rejected with  $p = 0.0003$ ; median = 144 ms, interquartile range = 111.2 ms). (c) Amplitude (maximum value of the ripple RMS envelope) specified in SDs of the background noise (z-scores) (Kolmogorov–Smirnov normality test with  $p = 0.9444$ ; mean = 10.07 z-units, SD = 2.63 z-units). (d) Peak frequency of ripple events (Kolmogorov–Smirnov normality test, null hypothesis rejected with  $p = 0.0112$ ; median = 169.25 Hz; interquartile range = 29.25 Hz). (e) Scatter plot of amplitude versus duration of ripple events (Pearson's corr.  $R = 0.423185$ , Student's  $t$ -test with  $p < 10^{-6}$ ). The red line indicates a linear fit of the data. (f) Visual Pearson's correlation matrix for amplitude, duration, and frequency of ripple events. (g) ROC curves for offline MATLAB simulations of the plugin. The color bar and the respective color dots represent different time threshold values (ms). Various amplitude threshold values (specified in SDs) are represented by different curve line colors (blue: SDs = 2, orange: SDs = 3, yellow: SDs = 4, purple: SDs = 5, green: SDs = 6, light blue: SDs = 7, red: SDs = 8). The dashed square is a zoom of the top left corner of the ROC graph. The dashed line indicates the closest point (97.9% TPR and 2.29 FP min<sup>-1</sup>) to the optimal reference.

true ripple event. The end-up number of confirmed ripples was 345 (11 events per minute). Then, multiple simulation sessions of the developed algorithm were conducted in MATLAB with different amplitude and time thresholds to obtain the corresponding ROC curves (figure 2(g)). Many combinations of threshold

values resulted in satisfactory detection rates, and the closest to the optimal cut-off point of the ROC graph, considering the Euclidean distance of the normalized coordinates, was 97.9% TPR and 2.29 FP min<sup>-1</sup> (amplitude threshold of 4 SDs and time threshold of 12 ms).

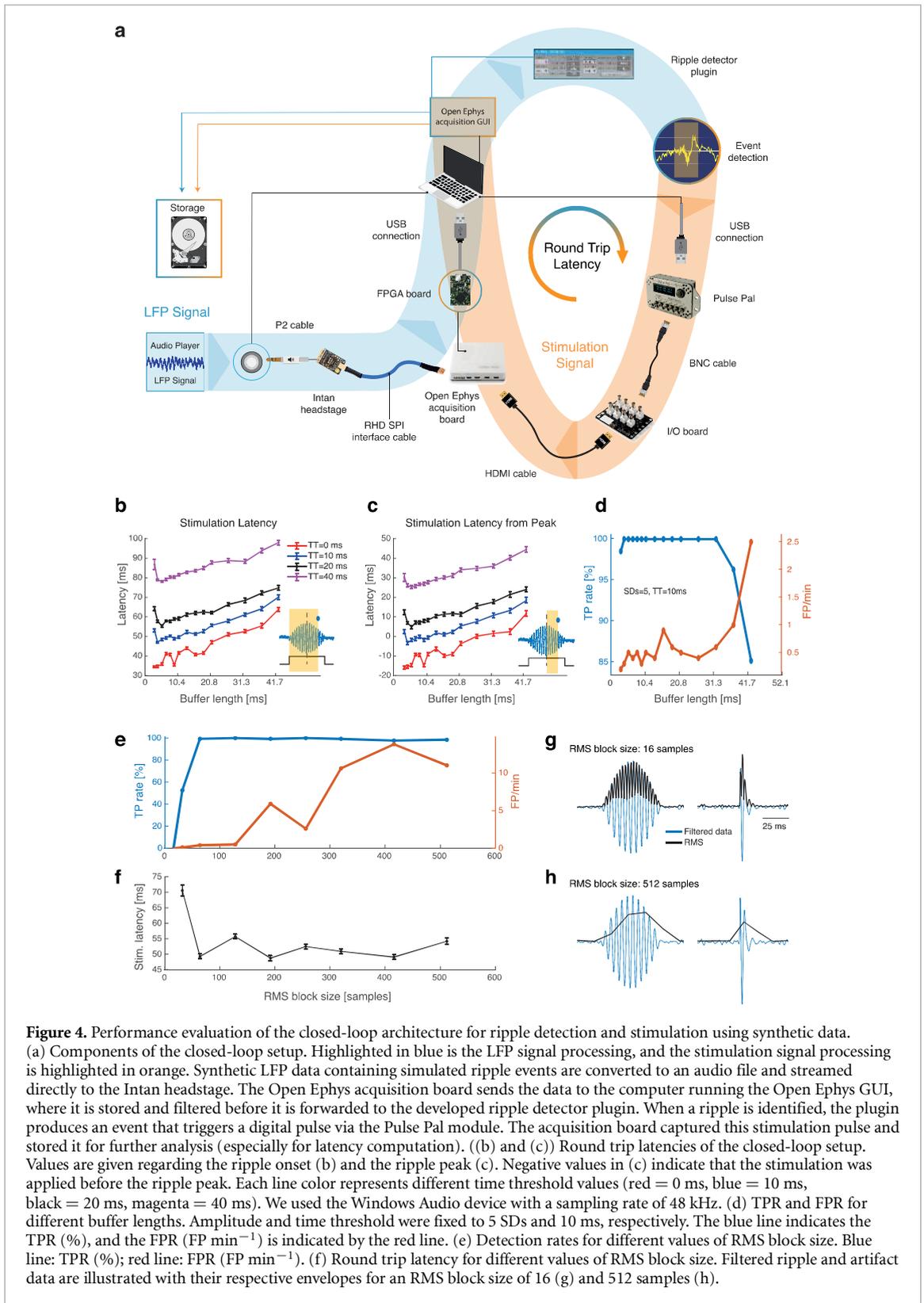


It is worth noting that the sensitivity and the specificity of the detection may vary depending on the recording conditions or the brain state during the algorithm's calibration period (figure 3). Since the amplitude threshold is set in terms of standard deviations above the average, a calibration window with increased power in the ripple band produces more selective (higher) detection thresholds. This is the case, for instance, when the calibration stage occurs while the animal is awake: due to a general increase in the ripple band power, the sensitivity and FPR curves are anticipated (shifted to the left) regarding the amplitude threshold (figure 3(b)). Prior to the conduction of valid recordings, it is recommended the standardization of calibration moments among the experimental subjects and the execution of pilot recordings for adjusting the threshold according to the experimental requirements.

### 3.2. Real-time, closed-loop experiments using Open Ephys with synthetic data

Offline simulation offers an acceptable output of the detection algorithm when its purpose is to perform

a preliminary validation of the theoretical concepts behind the implemented logic (e.g. adjusting sensitivity by changing the detection thresholds). The MATLAB implementation of the detection algorithm does not mimic with fidelity some aspects of the recording setup with Open Ephys, such as small random fluctuations in the data buffer delivery, communication delays between the hardware components, and contamination by different sources of electrical noise. Therefore, some performance indicators are more reliable when obtained from an experimental scenario similar to that used during real experiments. One of these performance indicators is the round trip latency: the delay between the ripple onset and the stimulation/manipulation command in closed-loop systems. In most experiments that sought to interfere in neuronal circuits in a real-time, ripple-dependent manner, the round trip delay must be as minimum as possible without impacting negatively and significantly the detection rates (TPR and FPR). Those experiments commonly include SWR disruption itself (Girardeau *et al* 2009, Jadhav *et al* 2012 and many other studies shown in table 1), but also the



**Figure 4.** Performance evaluation of the closed-loop architecture for ripple detection and stimulation using synthetic data. (a) Components of the closed-loop setup. Highlighted in blue is the LFP signal processing, and the stimulation signal processing is highlighted in orange. Synthetic LFP data containing simulated ripple events are converted to an audio file and streamed directly to the Intan headstage. The Open Ephys acquisition board sends the data to the computer running the Open Ephys GUI, where it is stored and filtered before it is forwarded to the developed ripple detector plugin. When a ripple is identified, the plugin produces an event that triggers a digital pulse via the Pulse Pal module. The acquisition board captured this stimulation pulse and stored it for further analysis (especially for latency computation). ((b) and (c)) Round trip latencies of the closed-loop setup. Values are given regarding the ripple onset (b) and the ripple peak (c). Negative values in (c) indicate that the stimulation was applied before the ripple peak. Each line color represents different time threshold values (red = 0 ms, blue = 10 ms, black = 20 ms, magenta = 40 ms). We used the Windows Audio device with a sampling rate of 48 kHz. (d) TPR and FPR for different buffer lengths. Amplitude and time threshold were fixed to 5 SDs and 10 ms, respectively. The blue line indicates the TPR (%), and the FPR (FP min<sup>-1</sup>) is indicated by the red line. (e) Detection rates for different values of RMS block size. Blue line: TPR (%); red line: FPR (FP min<sup>-1</sup>). (f) Round trip latency for different values of RMS block size. Filtered ripple and artifact data are illustrated with their respective envelopes for an RMS block size of 16 (g) and 512 samples (h).

manipulation of different brain areas associated with ripple activity and its biological functions (Maingret et al 2016).

A closed-loop architecture was assembled to measure the round trip latency (figure 4(a)), and the

LFP of the living animal was replaced by the synthetic data converted to an audio signal. The data acquisition system recorded the stimulation command back. Because the time threshold theoretically imposes an intrinsic algorithmic delay to the ripple detection,

we initially sought to confirm the impact of increasing this parameter on the round trip latency. In this case, the amplitude threshold was fixed to 5 standard deviations above the mean. Increments in the time threshold are followed by an almost equivalent increase in the latency (figures 4(b) and (c)). Buffer length also plays an important role in the round trip delay. This parameter can be manually adjusted in the Open Ephys GUI at runtime, and it was observed that higher buffer lengths increased the round trip latency, probably due to the intrinsic additional time to accumulate more data samples. By setting the time threshold to 0 ms, a mean delay of around 35 ms ( $34.5 \pm 0.5$  ms) from the beginning of the ripples (figure 4(b)) or around 15 ms ( $15.9 \pm 0.8$  ms) before the ripple peak (figure 4(c)) was obtained when buffer length was minimal (3 ms). It is worth noting that, for the synthetic data, the ripple power peak matches half the duration of the event. Buffer length also affects on the detection rates, worsening TPR and FPR as it approaches the maximum tested value of 42.7 ms (figure 4(d)).

The detection algorithm operates with the ripple-band filtered signal envelope given by the RMS values of sequential blocks of samples. To verify how the quality of the RMS contour may affect latency and detection rates, the plugin's performance was checked for different values of RMS window lengths (number of samples used to calculate this metric). The amplitude threshold was then fixed to 5 SDs, the time threshold to 10 ms, and the buffer length to 21.3 ms. Shorter RMS sample blocks (i.e. 16 or 32 samples) produce a fast-tracking envelope that constantly resets the algorithm before the time threshold is fully accomplished, resulting in lower TPR (figures 4(e) and (g)). On the other hand, extremely large RMS blocks (i.e. 512 samples) extend spike duration and contribute to increasing FPR (figures 4(e) and (h)). Regarding the latency, we initially thought that larger RMS blocks would result in higher detection (and thus stimulation) delay. However, the results do not indicate a rising latency trend following increments in the RMS length (figure 4(f)). Instead, smaller blocks seem to impose an additional delay due to the resetting mechanism.

It is worth noting that the RMS block length must be adjusted according to the sampling frequency to avoid the drawbacks of selecting extreme values. We suggest 2.5 RMS values per period of the lowest frequency in the ripple band for an acceptable envelope. Because 100 Hz was the lowest ripple-band frequency used in this study (period of 10 ms), it corresponds to 4 ms of data comprised in each RMS value. With a sampling frequency of 30 kHz (the same used to build the synthetic data), the recommended RMS length would include 120 samples. For other values of sampling frequency ( $F_s$ ) and lowest ripple-band

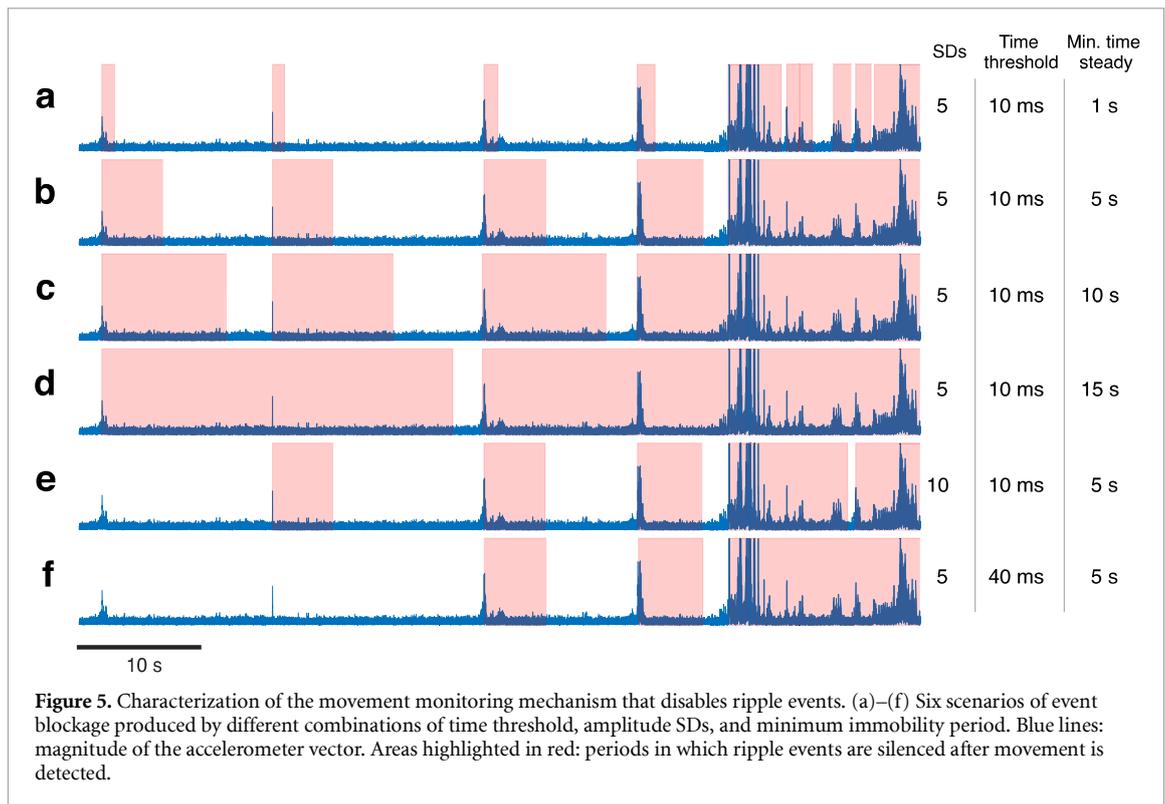
frequency ( $L_f$ ), the suggested RMS block length can be calculated as:

$$\text{RMS block length [samples]} = \frac{F_s}{2.5 \times L_f}. \quad (3)$$

Based on the results obtained with the synthetic and real datasets tested in this work, our recommendation of parameters for general ripple detection is 5 SDs for amplitude threshold, 10 ms for time threshold, 21.3 ms for the buffer length, 140 ms for the refractory time, and an RMS block length that follows equation (3). Those values led to 97% of TPR and  $2.48 \text{ FP min}^{-1}$  for the real data. Regarding the synthetic data, the same detection parameters resulted in 100% of TPR,  $0.5 \text{ FP min}^{-1}$ , and a mean round trip latency of 55.7 ms from the ripple onset or 5.3 ms from the ripple peak. Although it is possible to decrease the latency even more by reducing the amplitude and time thresholds, investigators must be aware of the trade-offs concerning the detection rates, especially the FPR. Finally, we recommend executing prior recordings to optimally adjust the detection parameters according to the experimental requirements and conditions. The File Reader plugin from the Open Ephys GUI can be used for the initial calibration of the ripple detector parameters. For this purpose, MATLAB scripts that convert the recorded data to a File Reader compatible file are available at [www.github.com/open-ephys/analysis-tools](http://www.github.com/open-ephys/analysis-tools).

### 3.3. Disabling ripple detection by monitoring movement in real-time

*In vivo* experiments involving long-lasting electrophysiological recordings and real-time, ripple-triggered manipulations may benefit from an automatic mechanism that prevents events from being raised when movement is detected. Especially when stimulation must be performed only during sleep or immobile wakefulness, the ripple-band power augmentation caused by movement artifacts may generate spurious events that interfere with the experimental protocol. To initially verify and characterize the mechanism that blocks ripple events based on movement detection, we used real 3-axis accelerometer data publicly available (Petersen *et al* 2020). The accelerometer data was converted to an appropriate file and loaded in Open Ephys GUI with the File Reader module. The detection algorithm first calculates the magnitude of the acceleration vector based on its 3-axis filtered data (100–250 Hz) and then proceeds with RMS computation, calibration, verification of threshold crossing, and, if necessary, event blockage (detailed description in section 2.2). As expected, higher amplitude thresholds decrease the plugin's ability to detect small changes in acceleration (figure 5(b)) compared



to (e)). This decreased sensitivity favors experimental scenarios in which stimulation should be applied despite small movements during brief periods of micro-arousals (Dos Santos Lima *et al* 2019), for example. It was also observed that an increase in the time threshold permits only longer, persistent speed-changing movements disable ripple events (figure 5(b) compared to (f)). Finally, increments in the minimum period of immobility required to restore the plugin's capacity to trigger stimulation result in longer-lasting blockage (figures 5(a)–(d)). The minimum period of immobility controls the extension of the silencing, and it can be adjusted, if necessary, to prevent LFP transients during short periods of immobile wakefulness from triggering stimulation.

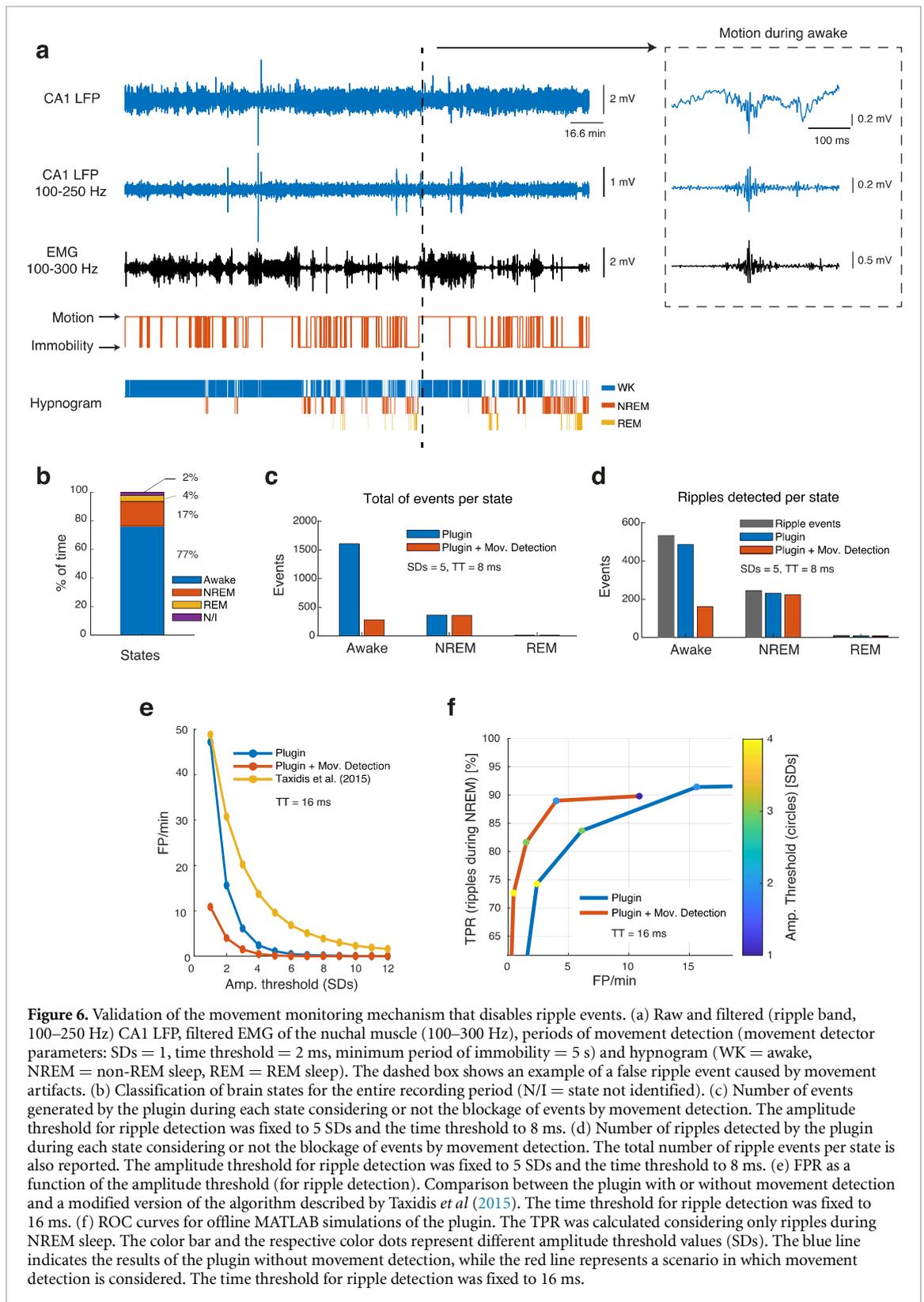
After characterizing the operation of the movement-based algorithm that prevents ripple detection, we validated its capacity to reduce detected events during periods of motion. We used recordings of the CA1 LFP, the EMG of the nuchal muscle and the mPFC LFP from a freely behaving Wistar rat during the first 4 h of the light phase (details in section 2.10) (figure 6(a)). Movement was monitored based on the bandpassed (100–300 Hz) EMG signal. The mPFC data were particularly helpful for the offline classification of the animal's brain states (section 2.11).

The interruption of detection during periods of mobility was effective in reducing the number of events particularly during wakefulness (figure 6(c)). This reduction occurred not only by preventing the detection of movement artifacts (see an example in figure 6(a)) and other types of false positives, but

also by limiting the detection of true awake ripples (figure 6(d)). We also compared the global FPR for three distinct detection strategies: (1) plugin with movement monitoring enabled; (2) plugin without movement monitoring; and (3) a modified version of the algorithm described by Taxidis *et al* (2015) which is used in this work for the prior identification of ripples. Although the latter was not specifically designed for online detection and contains a different subset of parameters, it is still threshold-based. This condition reasonably allows us to verify the influence of a common parameter—the amplitude threshold—on the FPR. For different values of amplitude threshold, the developed plugin presented reduced FPR, especially when movement detection was enabled (figure 6(e)). The considerable reduction in the FPR provided by the movement detection occurred without significant impairment on the TPR during the NREM sleep (figure 6(f)). Furthermore, by using the movement monitoring strategy, it is possible to obtain better NREM accuracy with lower amplitude threshold (for instance, 89% TPR and 4 FP min<sup>-1</sup> for SDs = 2 with movement monitoring compared to 83.7% TPR and 6.1 FP min<sup>-1</sup> for SDs = 3 without movement monitoring). It is worth noting that, whenever it is acceptable from the perspective of the detection accuracy, the choice of lower amplitude thresholds is preferable since it favors decreased round trip latencies.

### 3.4. Multichannel ripple detection

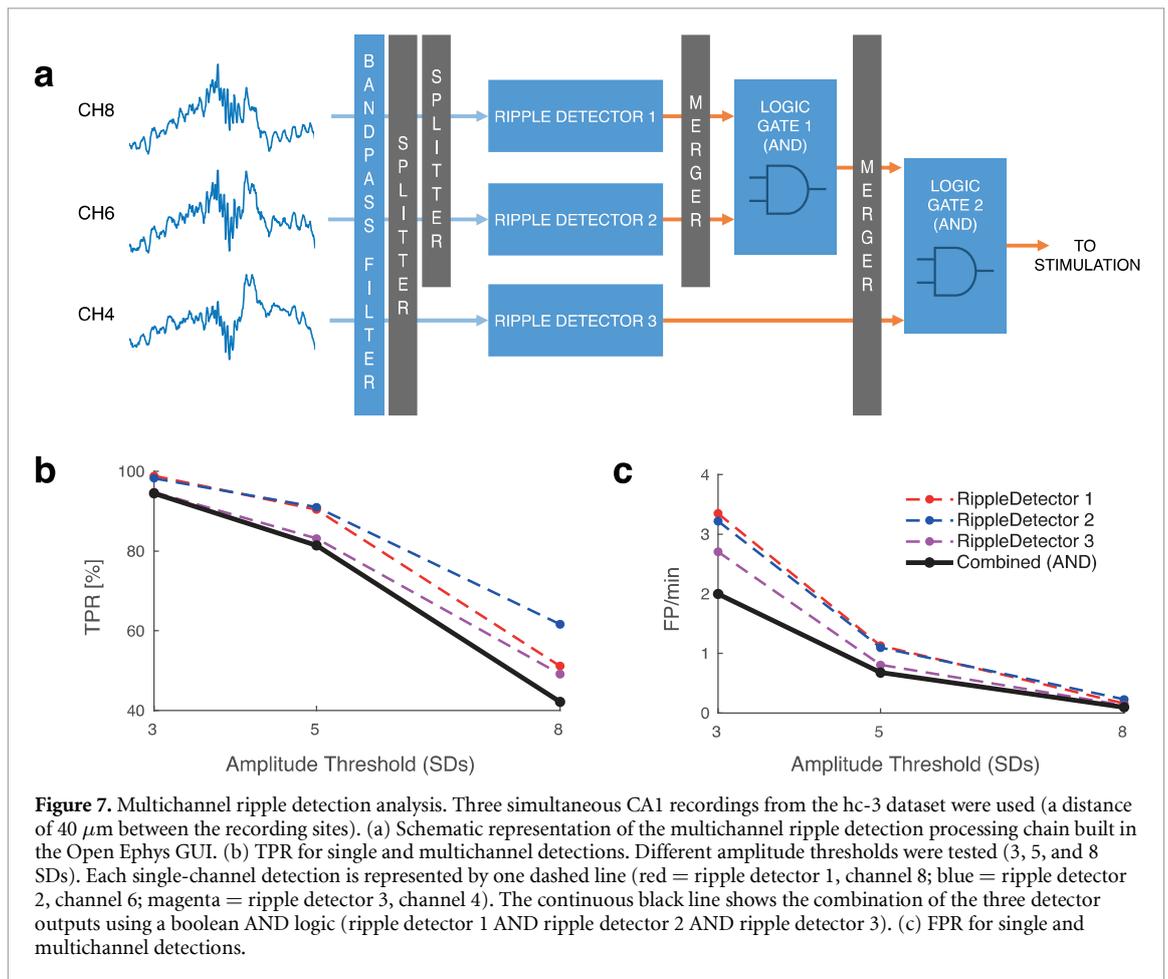
Electrophysiological recordings of the hippocampus are commonly carried out using multiple electrode



**Figure 6.** Validation of the movement monitoring mechanism that disables ripple events. (a) Raw and filtered (ripple band, 100–250 Hz) CA1 LFP, filtered EMG of the nuchal muscle (100–300 Hz), periods of movement detection (movement detector parameters: SDs = 1, time threshold = 2 ms, minimum period of immobility = 5 s) and hypnogram (WK = awake, NREM = non-REM sleep, REM = REM sleep). The dashed box shows an example of a false ripple event caused by movement artifacts. (b) Classification of brain states for the entire recording period (N/I = state not identified). (c) Number of events generated by the plugin during each state considering or not the blockage of events by movement detection. The amplitude threshold for ripple detection was fixed to 5 SDs and the time threshold to 8 ms. (d) Number of ripples detected by the plugin during each state considering or not the blockage of events by movement detection. The total number of ripple events per state is also reported. The amplitude threshold for ripple detection was fixed to 5 SDs and the time threshold to 8 ms. (e) FPR as a function of the amplitude threshold (for ripple detection). Comparison between the plugin with or without movement detection and a modified version of the algorithm described by Taxisidis *et al* (2015). The time threshold for ripple detection was fixed to 16 ms. (f) ROC curves for offline MATLAB simulations of the plugin. The TPR was calculated considering only ripples during NREM sleep. The color bar and the respective color dots represent different amplitude threshold values (SDs). The blue line indicates the results of the plugin without movement detection, while the red line represents a scenario in which movement detection is considered. The time threshold for ripple detection was fixed to 16 ms.

arrays. Ripples are commonly observed in the CA1 pyramidal layer, and their shape varies with the depth of the implant (Buzsaki 2015, Ramirez-Villegas *et al* 2015). In this scenario, a multichannel ripple detection logic offers the possibility to enhance the detector’s accuracy. We verified the combined ripple detection performance for amplitude threshold

values using three simultaneous CA1 recordings from hc-3, the same dataset used in section 3.1. The corresponding electrode tips were vertically 40  $\mu\text{m}$  apart from one another, and the silicon probe shank was aligned parallel to the septo-temporal axis (45° parasagittal) (Mizuseki *et al* 2014). Because the audio output is limited to 2 channels, the File Reader



**Figure 7.** Multichannel ripple detection analysis. Three simultaneous CA1 recordings from the hc-3 dataset were used (a distance of  $40\ \mu\text{m}$  between the recording sites). (a) Schematic representation of the multichannel ripple detection processing chain built in the Open Ephys GUI. (b) TPR for single and multichannel detections. Different amplitude thresholds were tested (3, 5, and 8 SDs). Each single-channel detection is represented by one dashed line (red = ripple detector 1, channel 8; blue = ripple detector 2, channel 6; magenta = ripple detector 3, channel 4). The continuous black line shows the combination of the three detector outputs using a boolean AND logic (ripple detector 1 AND ripple detector 2 AND ripple detector 3). (c) FPR for single and multichannel detections.

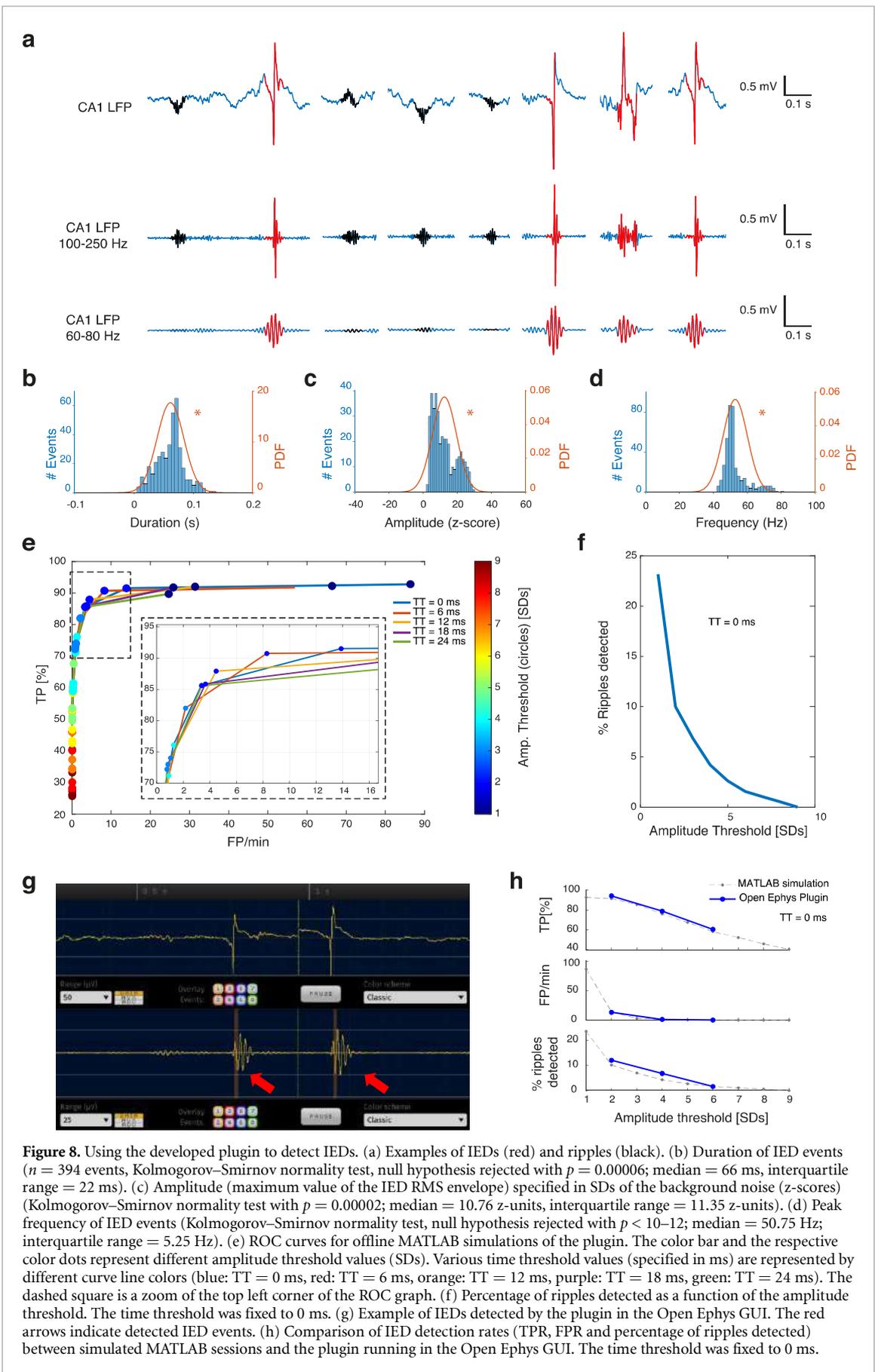
module was used to stream the 3-channel data. An Open Ephys processing chain was set up to combine the outputs of 3 ripple detector modules in a boolean AND logic, each detector applied over a different single channel (figure 7(a)). The Logic Gate module, a third-party plugin developed for the Open Ephys GUI, was used for the logical processing of the individual outputs (Buccino *et al* 2018). As expected by using the AND expression, the TPR of the combined strategy was limited by the lowest sensitivity of an individual detector (figure 7(b)). Moreover, by triggering an event only when all the individual detectors identify a ripple simultaneously, the global FPR can be reduced (figure 7(c)). We intend to implement a customizable, multichannel algorithm internally in future releases of our ripple detector.

### 3.5. Detecting other neural events using the plugin: a case study for IEDs

Since the detection algorithm is based on RMS threshold crossing, it should be possible to detect other types of neural events by adapting the detection parameters and the cutoff frequencies of the band-pass filter module. We tested the use of the developed plugin to detect IEDs in the hippocampus of a kindling model of epilepsy (see section 2.9 for more details). IEDs are pathological markers associated

with cognitive impairment, including many aspects of memory formation, and are used to identify epileptic brain regions (Gelinas *et al* 2016, Horak *et al* 2017). They are characterized by abrupt, spiky changes in the LFP and can be easily differentiated from ripples in the frequency domain due to their lower frequency components (60–80 Hz; figure 8(a)).

Initially, we identified IED events offline by using the algorithm described in the work of Gelinas *et al* (2016). Each event detected was visually inspected to ensure that it was not noise (a total of 394 events, 13.8 per minute, were confirmed as IEDs). The performance of the developed algorithm to detect IEDs was first evaluated by running multiple simulation sessions in MATLAB with different combinations of thresholds. The detection rates closest to the optimal cut-off point of the ROC graph corresponded to 87.9% TPR and  $4.48\ \text{FP}\ \text{min}^{-1}$  (amplitude threshold of 2 SDs and time threshold of 12 ms) (figure 8(e)). As for the ripple detection, it is possible to adjust the detection thresholds to balance sensitivity and FPR. Higher amplitude thresholds, for example, can be used not only to reduce the global number of false-positive events, but also to discard eventual ripples that leaked the IED frequency band (figure 8(f)). Finally, we verified the operation of the plugin running into the Open Ephys GUI for



the same dataset. IEDs were successfully detected and the accuracy was similar to that observed in the MATLAB simulations for the subset of parameters tested (figures 8(g) and (h)).

#### 4. Discussion

We presented the development and the validation of a ripple detector plugin integrated with the Open Ephys data acquisition platform. The plugin has a user-friendly graphical interface that allows investigators to adjust some detection parameters to balance round trip delay versus detection accuracy. Furthermore, its open-source nature allows community-aided improvements, and the adaptation of the internal algorithms for particular needs. In addition, to reduce spurious stimulation and enhance the quality of the experiments that investigate the importance of SWRs to memory and other processes, we developed a built-in, automatic on/off mechanism based on movement detection.

The results suggest an important interaction between the detection parameters and the performance trade-offs (i.e. round trip delay and detection accuracy). An increase in the time threshold, for instance, reduces the false-positive rate while imposing more delay to generate the stimulation. The consequences of varying other parameters than those directly related to the detection thresholds (i.e. buffer length and RMS block size) must also be considered. As shown in this work, the RMS block size affects the quality of the envelope and should be adjusted to avoid both the signal shifting and the over-representation of ripple cycles. Likewise, shorter buffer lengths may not contain the appropriate number of samples to calculate the RMS, while the longer ones are associated with increased stimulation delay. The mutual interaction between the parameters and the detection trade-offs are probably unknown by the investigators, as suggested by the absence of performance reports (table 1), and can impair their experimental protocols and the associated results. In a worst-case scenario, the effects observed in experimental groups may result from the excessive intervention itself due to a detection algorithm with low specificity. Similarly, rapidly-triggered but insufficient manipulations due to a low-sensitivity detection may contribute to the absence of effect between groups. It is worth noting that the choice between accuracy and latency is intimately connected to the hypothesis being tested and the experimental design. Depending on the study, it may be acceptable or even desirable to prioritize one of those features over the other without major impairments. In any case, the detection system must be previously well-characterized to the setup being used.

Another important aspect we addressed was the need to avoid movement artifacts from triggering the stimulation/manipulation system. The integrated

algorithm that prevents ripple events from being raised during mobility periods reduces false positives and the effects of inappropriate stimulation. We also demonstrated that our plugin is able to perform unsupervised ripple detection specifically during sleep. Furthermore, because our plugin has an automatic mechanism of disabling ripple detection during movement, it exempts investigators from the continuous inspection and manual on/off intervention, supporting the execution of simultaneous recordings in different animals. To date, there is no other available (and ready-to-use) tool that provides this possibility of performing automatic real-time ripple detection during sleep.

One advantage of implementing movement detection based on the accelerometer or EMG data, as proposed in this work, is that those signals are usually already present in memory and sleep studies to determine the animal states (wakefulness or sleep) (Boyce *et al* 2016, Koike *et al* 2017, Dos Santos Lima *et al* 2019). However, different strategies have been used throughout the literature to prevent movement artifacts from resulting in false detection. One of those strategies is to implement a speed filter based on the live image of the behaving animal to block the generation of stimulation events when the animal's speed crosses a predefined threshold (around  $5 \text{ cm s}^{-1}$ , table 1). The limitations of this approach reside in the inability to detect movement artifacts while the animal's position remains unchangeable. That includes chewing, grooming, and headstage knocking against the box, for example. Another strategy is based on positioning a reference or control electrode outside the hippocampal formation to detect common LFP transients that leak the ripple frequency range (Talakoub *et al* 2016, van de Ven *et al* 2016, Oliva *et al* 2020). The simultaneous occurrence of these high-frequency transients in a non-hippocampal region is used to cancel the 'ripple' detection in the hippocampal recording channel. Besides demanding an additional implant, this scheme may present a disadvantage when used in experiments of selective manipulation during sleep. Since the LFP of the control electrode may remain smooth during wake periods of low mobility, awake ripples are detected without distinction. With none or a few extra programming lines in the plugin's source code, it is possible to use the control channel to turn off stimulation as it provides EMG data. Indeed, what the movement detection algorithm generically does is to verify significant changes in the RMS of the selected channel using the logic of threshold crossing already described. An alternative approach is to use an additional plugin instance on the control electrode channel to implement a cortical 'NOT' and block ripple events.

The lowest round trip latency mean reported in our closed-loop experiments was  $34.5 \pm 0.5 \text{ ms}$  for a buffer length of 3 ms, amplitude threshold of 5 SDs,

and no time threshold (figure 4(b), red line). This latency corresponds to  $15.9 \pm 0.8$  ms before the ripple peak. Apart from the time threshold, that imposes an intrinsic algorithmic delay (figure 4), one of the most significant components of the round trip latency is the USB communication that links the computer executing the Open Ephys GUI to the data acquisition system and the Pulse Pal module. This USB overhead is around 20 ms (Siegle *et al* 2017). Investigators interested in reducing the round trip latency can achieve it by lowering the amplitude threshold, the time threshold and/or the buffer length, but they should keep in mind the possible consequences on the detection rates. Because the plugin is open-source, it is also possible to integrate it with devices that accept communication protocols faster than USB (i.e. Ethernet or PCI express). For example, Neuropixels probes (which use a PCIe-based acquisition system; Jun *et al* 2017, Putzeys *et al* 2019) readily integrate with the Open Ephys GUI and would therefore be immediately compatible with our ripple detection system. Additionally, other initiatives (Open Ephys 2016) and a new generation of the Open Ephys acquisition system are being developed to support submillisecond closed-loop systems with PCI express ([open-ephys.github.io/onix-docs/](https://open-ephys.github.io/onix-docs/)). Although the USB overheads impose an intrinsic, considerable delay, the final latency is acceptable for many applications that are not usually accessible to neuroscientists (Siegle *et al* 2017). That includes brain-machine interface systems and experiments involving ripple-triggered manipulations, whether in the hippocampus or other brain areas.

Finally, we showed that the plugin can be adapted to detect IEDs in a kindling model of epilepsy. Because it is based on RMS threshold crossing, we believe that even other electrophysiological events, whether physiological (e.g. thalamocortical spindles) or pathological ones (e.g. electrographic seizures), can be detected after appropriate adjustments in the bandpass frequencies and in the detection parameters. In this case, and in order to have a representative envelope of the filtered signal, one of the key parameters that must be adjusted is the RMS length (see equation (3)).

For future work, we intend to implement multichannel detection inside the plugin's structure and evaluate how additional channels impact the round trip latency. In addition, testing different boolean equations is important to achieve better accuracy. In experiments that demand the operation of the plugin for long periods, the parameters calculated in the calibration stage might become less representative over time. Although the calibration button in the plugin's GUI allows the recalculation of RMS mean and standard deviation, it would be useful to develop and test an algorithm for continuously estimating these parameters.

## Data availability statement

The data that support the findings of this study are openly available at the following URL/DOI: <https://github.com/bmsousa91/RippleDetector>.

## Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq, Brazil (422911/2021-6), the Minas Gerais Research Foundation, FAPEMIG (Universal APQ-00246-21), the São Paulo Research Foundation, FAPESP (2015/25275-8 and 2016/17882-4), and the International Society for Neurochemistry (CAEN-1B and CDG programs). We would like to thank Flávio Mourão for the discussions during the development of this work and Alysson Silva for the initial support on programming. We also thank Cláudio Queiroz, Michaël Zugaro and Josh Siegle for the valuable comments on this manuscript.

## Conflict of interest

The authors declare no competing interests.

## ORCID iDs

Bruno Monteiro de Sousa  <https://orcid.org/0000-0002-0529-6694>

Eliezyer Fermino de Oliveira  <https://orcid.org/0000-0002-9651-8570>

Ikaro Jesus da Silva Beraldo  <https://orcid.org/0000-0003-3900-0043>

Rafaela Schuttenberg Polanczyk  <https://orcid.org/0000-0002-9893-6872>

João Pereira Leite  <https://orcid.org/0000-0003-0558-3519>

Cleiton Lopes Aguiar  <https://orcid.org/0000-0001-9310-6338>

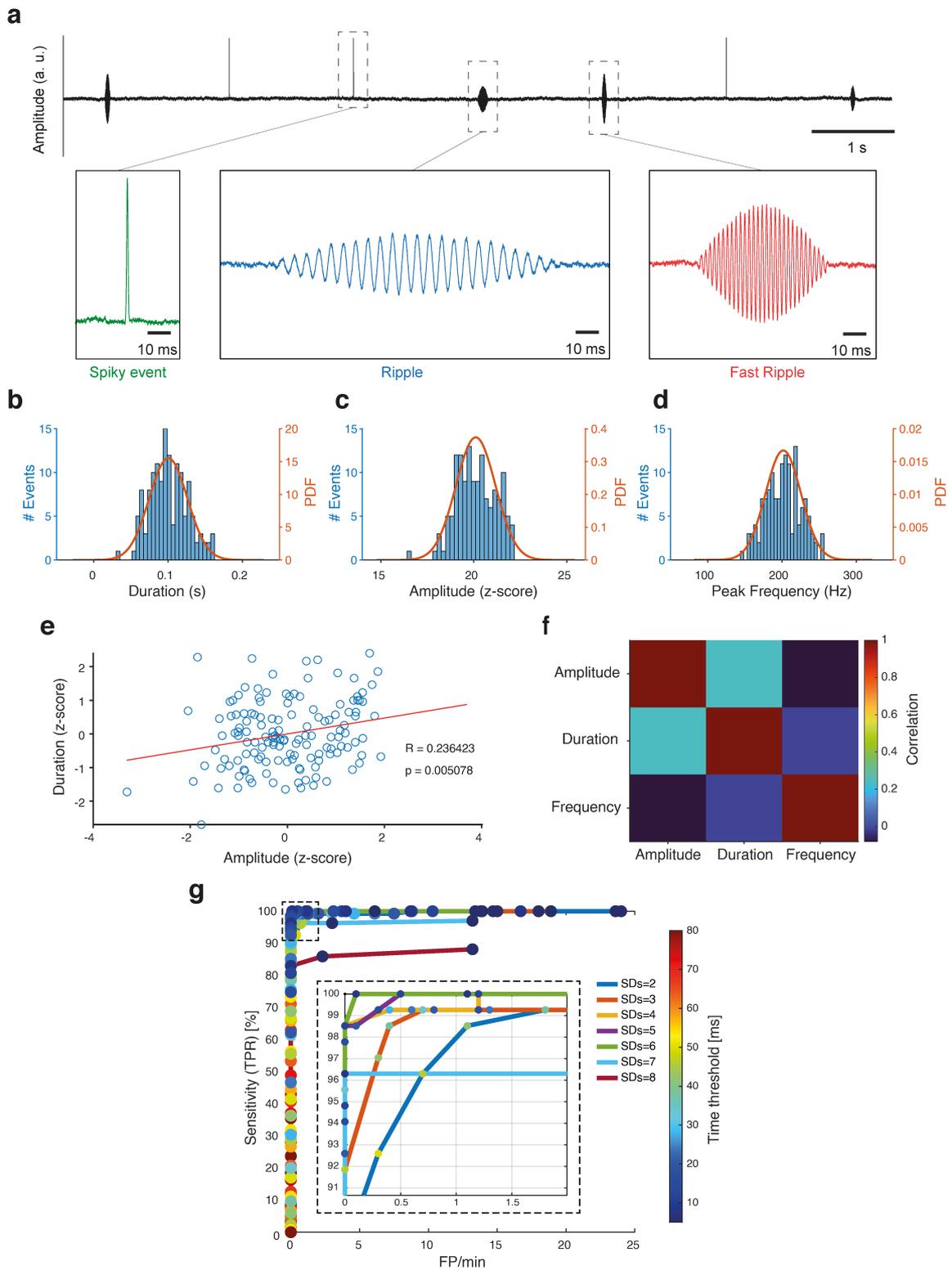
## References

- Adamantidis A R, Gutierrez Herrera C and Gent T C 2019 Oscillating circuitries in the sleeping brain *Nat. Rev. Neurosci.* **20** 746–62
- Aleman-Zapata A, Morris R G M and Genzel L 2020 Fast and slow cortical high frequency oscillations for cortico-cortical and cortico-hippocampal network consolidation during NonREM sleep *bioRxiv Preprint* (<https://doi.org/10.1101/765149>) (posted online 30 August 2020, accessed 14 March 2022)
- Aleman-Zapata A, van der Meij J and Genzel L 2021 Disrupting ripples: methods, results, and caveats in closed-loop approaches in rodents *J. Sleep Res.* **e13532**
- Boyce R, Glasgow S D, Williams S and Adamantidis A 2016 Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation *Science* **352** 812–6
- Bragin A, Engel J Jr, Wilson C L, Fried I and Mathern G W 1999 Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100–500 Hz) in human epileptic brain and in

- kainic acid-treated rats with chronic seizures *Epilepsia* **40** 127–37
- Buccino A P, Lepperod M E, Dragly S A, Hafliger P, Fyhn M and Hafting T 2018 Open source modules for tracking animal behavior and closed-loop stimulation based on Open Ephys and Bonsai *J. Neural Eng.* **15** 055002
- Buzsáki G 2015 Hippocampal sharp wave-ripple: a cognitive biomarker for episodic memory and planning *Hippocampus* **25** 1073–188
- Buzsáki G, Horvath Z, Urioste R, Hetke J and Wise K 1992 High-frequency network oscillation in the hippocampus *Science* **256** 1025–7
- Csicsvari t, Hirase H, Czúrkó A, Mamiya A and Buzsáki G 1999 tFast Network Oscillations in the Hippocampal CA1 Region of the Behaving Rat *J. Neurosci.* **19** RC20
- de Lavilleon G, Lacroix M M, Rondi-Reig L and Benchenane K 2015 Explicit memory creation during sleep demonstrates a causal role of place cells in navigation *Nat. Neurosci.* **18** 493–5
- Dos Santos Lima G Z, Lobao-Soares B, Corso G, Belchior H, Lopes S R, de Lima Prado T, Nascimento G, Franca A C, Fontenele-Araujo J and Ivanov P C 2019 Hippocampal and cortical communication around micro-arousals in slow-wave sleep *Sci. Rep.* **9** 5876
- Drieu C, Todorova R and Zugaro M 2018a Nested sequences of hippocampal assemblies during behavior support subsequent sleep replay *Science* **362** 675–9
- Drieu C, Todorova R and Zugaro M 2018b Bilateral recordings from dorsal hippocampal area CA1 from rats transported on a model train and sleeping (CRCNS.org) (<https://doi.org/10.6080/KOZ899MM>)
- Dutta S, Ackermann E and Kemere C 2019 Analysis of an open source, closed-loop, realtime system for hippocampal sharp-wave ripple disruption *J. Neural Eng.* **16** 016009
- Ego-Stengel V and Wilson M A 2010 Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat *Hippocampus* **20** 1–10
- Fernandez-Ruiz A, Oliva A, de Oliveira E F, Rocha-Almeida F, Tingley D and Buzsáki G 2019 Long-duration hippocampal sharp wave ripples improve memory *Science* **364** 1082–6
- Gelinas J N, Khodagholy D, Thesen T, Devinsky O and Buzsáki G 2016 Interictal epileptiform discharges induce hippocampal-cortical coupling in temporal lobe epilepsy *Nat. Med.* **22** 641–8
- Girardeau G, Benchenane K, Wiener S I, Buzsáki G and Zugaro M B 2009 Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory *Nat. Neurosci.* **12** 1222–3
- Giri B, Miyawaki H, Mizuseki K, Cheng S and Diba K 2019 Hippocampal reactivation extends for several hours following novel experience *J. Neurosci.* **39** 866–75
- Gridchyn I, Schoenenberger P, O'Neill J and Csicsvari J 2020 Assembly-specific disruption of hippocampal replay leads to selective memory deficit *Neuron* **106** 291–300
- Horak P C et al 2017 Interictal epileptiform discharges impair word recall in multiple brain areas *Epilepsia* **58** 373–80
- Igata H, Ikegaya Y and Sasaki T 2021 Prioritized experience replays on a hippocampal predictive map for learning *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **118** e2011266118
- Jadhav S P, Kemere C, German P W and Frank L M 2012 Awake hippocampal sharp-wave ripples support spatial memory *Science* **336** 1454–8
- Jun J J et al 2017 Fully integrated silicon probes for high-density recording of neural activity *Nature* **551** 232–6
- Koike B D V et al 2017 Electrophysiological evidence that the retrosplenial cortex displays a strong and specific activation phased with hippocampal theta during paradoxical (REM) sleep *J. Neurosci.* **37** 8003–13
- Kovacs K A, O'Neill J, Schoenenberger P, Penttonen M, Ranguel Guerrero D K and Csicsvari J 2016 Optogenetically blocking sharp wave ripple events in sleep does not interfere with the formation of stable spatial representation in the CA1 area of the hippocampus *PLoS One* **11** e0164675
- Kudrimoti H S, Barnes C A and McNaughton B L 1999 Reactivation of Hippocampal Cell Assemblies: Effects of Behavioral State, Experience, and EEG Dynamics *J. Neurosci.* **19** 4090–101
- Maingret N, Girardeau G, Todorova R, Goutierre M and Zugaro M 2016 Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep *Nat. Neurosci.* **19** 959–64
- Michon F, Sun J J, Kim C Y, Ciliberti D and Kloosterman F 2019 Post-learning hippocampal replay selectively reinforces spatial memory for highly rewarded locations *Curr. Biol.* **29** 1436–44
- Mizuseki K, Diba K, Pastalkova E, Teeters J, Sirota A and Buzsáki G 2014 Neurosharing: large-scale data sets (spike, LFP) recorded from the hippocampal-entorhinal system in behaving rats *F1000Research* **3** 98
- Mizuseki K, Sirota A, Pastalkova E, Diba K and Buzsáki G 2013 Multiple single unit recordings from different rat hippocampal and entorhinal regions while the animals were performing multiple behavioral tasks (CRCNS.org) (<https://doi.org/10.6080/K09G5JRZ>)
- Mong J A and Cusmano D M 2016 Sex differences in sleep: impact of biological sex and sex steroids *Phil. Trans. R. Soc. B* **371** 20150110
- Nguyen D P, Kloosterman F, Barbieri R, Brown E N and Wilson M A 2009 Characterizing the dynamic frequency structure of fast oscillations in the rodent hippocampus *Front. Integr. Neurosci.* **3** 11
- Nokia M S, Mikkonen J E, Penttonen M and Wikgren J 2012 Disrupting neural activity related to awake-state sharp wave-ripple complexes prevents hippocampal learning *Front. Behav. Neurosci.* **6** 84
- Norimoto H, Makino K, Gao M, Shikano Y, Okamoto K, Ishikawa T, Sasaki T, Hioki H, Fujisawa S and Ikegaya Y 2018 Hippocampal ripples down-regulate synapses *Science* **359** 1524–7
- Novitskaya Y, Sara S J, Logothetis N K and Eschenko O 2016 Ripple-triggered stimulation of the locus coeruleus during post-learning sleep disrupts ripple/spindle coupling and impairs memory consolidation *Learn. Mem.* **23** 238–48
- Oliva A, Fernandez-Ruiz A, Leroy F and Siegelbaum S A 2020 Hippocampal CA2 sharp-wave ripples reactivate and promote social memory *Nature* **587** 264–9
- Open Ephys 2016 Submillisecond latency closed-loop feedback with PCIe prototype system (Blog post) (available at: <https://open-ephys.org/blog/2016/5/6/submillisecond-latency-closed-loop-feedback-with-pcie-prototype-system>) (Accessed 6 May 2016)
- Papale A E, Zielinski M C, Frank L M, Jadhav S P and Redish A D 2016 Interplay between hippocampal sharp-wave-ripple events and vicarious trial and error behaviors in decision making *Neuron* **92** 975–82
- Petersen P C, Hernandez M and Buzsáki G 2020 The Buzsáki lab databank—public electrophysiological datasets from awake animals (1.0) (Zenodo) (<https://doi.org/10.5281/zenodo.4307883>)
- Putzeys J et al 2019 Neuropixels data-acquisition system: a scalable platform for parallel recording of 10 000+ electrophysiological signals *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **13** 1635–44
- Ramirez-Villegas J F, Logothetis N K and Besserve M 2015 Diversity of sharp-wave-ripple LFP signatures reveals differentiated brain-wide dynamical events *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112** E6379–87
- Rangel Guerrero D K, Donnett J G, Csicsvari J and Kovacs K A 2018 Tetrode recording from the hippocampus of behaving mice coupled with four-point-irradiation closed-loop optogenetics: a technique to study the contribution of hippocampal SWR events to learning *eNeuro* **5** 87

- Roux L, Hu B, Eichler R, Stark E and Buzsaki G 2017 Sharp wave ripples during learning stabilize the hippocampal spatial map *Nat. Neurosci.* **20** 845–53
- Siegle J H, Lopez A C, Patel Y A, Abramov K, Ohayon S and Voigts J 2017 Open Ephys: an open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology *J. Neural Eng.* **14** 045003
- Stark E, Roux L, Eichler R, Senzai Y, Royer S and Buzsaki G 2014 Pyramidal cell-interneuron interactions underlie hippocampal ripple oscillations *Neuron* **83** 467–80
- Talakoub O, Palacio Schjetnan A G, Valiante T A, Popovic M R and Hoffman K L 2016 Closed-loop interruption of hippocampal ripples through fornix stimulation in the non-human primate *Brain Stimul.* **9** 911–8
- Taxidis J, Anastassiou C A, Diba K and Koch C 2015 Local field potentials encode place cell ensemble activation during hippocampal sharp wave ripples *Neuron* **87** 590–604
- Tingley D and Buzsaki G 2018 Transformation of a spatial map across the hippocampal-lateral septal circuit *Neuron* **98** 1229–42
- van de Ven G M, Trouche S, McNamara C G, Allen K and Dupret D 2016 Hippocampal offline reactivation consolidates recently formed cell assembly patterns during sharp wave-ripples *Neuron* **92** 968–74
- Zacharias L R 2019 Efeitos do abrasamento elétrico da amígdala basolateral em padrões oscilatórios durante o sono *Dissertação de Mestrado* Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (available at: [www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)) (Accessed 3 July 2022)

## Supplementarydata



**Figure S1.** Characterization of synthetic ripple data and corresponding ROC curves for offline simulations of the plugin in MATLAB. (a) Example of a synthetic data segment.

Simulated events (spiky events, ripples, and fast ripples) are inserted into a pink noise background signal. (b) Duration of ripple simulated events ( $n = 139$  events, Kolmogorov-Smirnov normality test with  $p = 0.5206$ ; mean = 100.4 ms, SD = 25.6 ms). (c) Amplitude (maximum value of the ripple RMS envelope) of simulated ripple events specified in SDs of the background noise (Kolmogorov-Smirnov normality test with  $p = 0.7856$ ; mean = 20.11 z-units, SD = 1.07 z-unit). (d) Peak frequency of ripple simulated events (Kolmogorov-Smirnov normality test with  $p = 0.93$ ; mean = 201.71 Hz; SD = 23.81 Hz). (e) Scatter plot of amplitude *versus* duration of simulated ripple events. The red line indicates a linear fit of the data. A small correlation was observed (Pearson's corr.  $R = 0.236423$ , Student's t-test with  $p = 0.005078$ ). (f) Visual Pearson's correlation matrix for amplitude, duration, and frequency of simulated ripple events. (g) ROC curves for multiple simulations with different pairs of threshold values (amplitude and time thresholds). The color bar and the respective color dots represent the time threshold (ms). Different amplitude thresholds (specified in SDs) are represented by different curve line colors (blue: SDs = 2, orange: SDs = 3, yellow: SDs = 4, purple: SDs = 5, green: SDs = 6, light blue: SDs = 7, red: SDs = 8). The dashed square is a zoom of the top left corner of the ROC graph (the optimal cut-off point), where the TPR is maximum (100%), and the FPR is minimum (0 FP/minute). The closest point achieved corresponds to 100% of TPR and 0.1 FP/min (time threshold of 6 ms and amplitude threshold of 6 SDs).

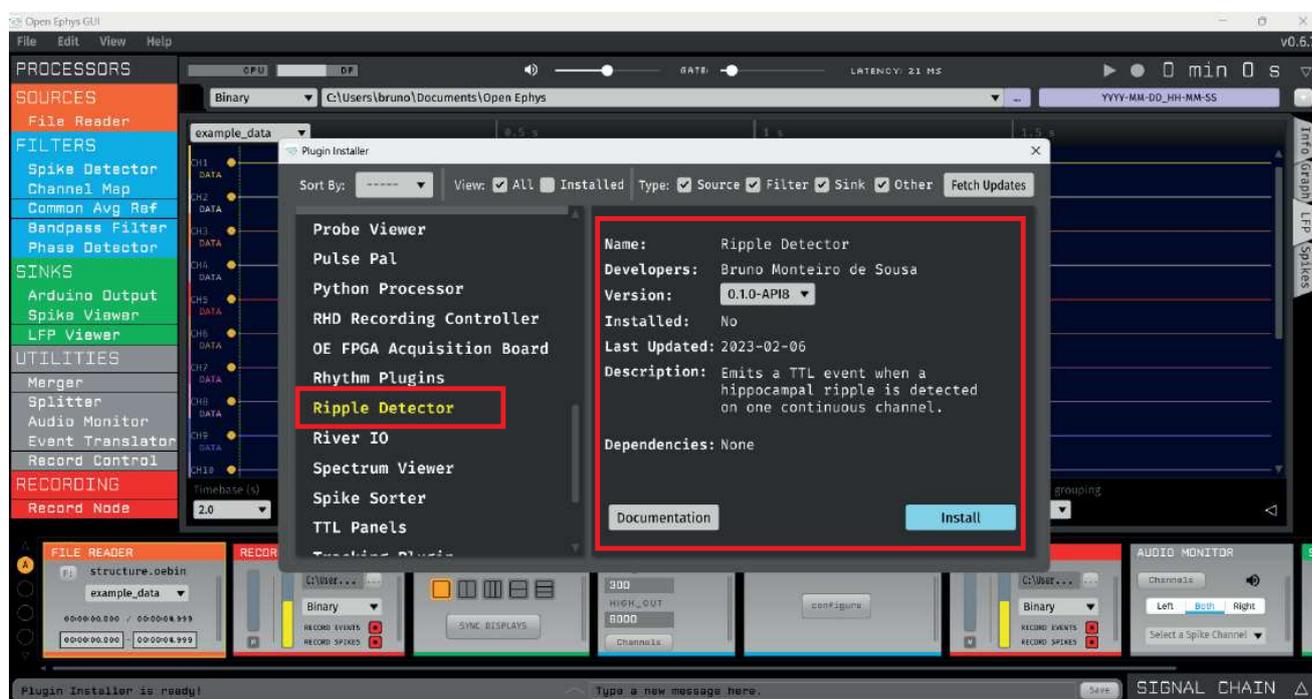
## 5 I: Discussão complementar

Desde a publicação do *plugin* de detecção de *ripples* e do artigo em 2022, alguns grupos de pesquisa entraram em contato para saber mais sobre a ferramenta e tirar dúvidas sobre como melhor utilizá-la. Os contatos vieram de pesquisadores da University College London (Londres, Inglaterra), da Caltech (Pasadena, EUA), da École Normale Supérieure (Paris, França) e de um grupo interessado em detectar SWRs em primatas no Center for Primate Brain Research (Songjiang, Xangai, China). Esses exemplos mostram que, de fato, a possibilidade de uso da ferramenta desenvolvida tem despertado interesse em membros da comunidade científica internacional e representa uma potencial contribuição para pesquisas futuras e já em andamento.

Além disso, depois de interações com a equipe de desenvolvimento do Open Ephys, o *plugin* de detecção de *ripples* foi incorporado de forma nativa à interface do sistema de aquisição. Isso significa que, ao fazer o *download* do *software* para registro eletrofisiológico com o Open Ephys, o próprio sistema já disponibiliza a opção para que o usuário instale o *plugin* (Figura 8). Tendo em vista a grande popularidade do Open Ephys atualmente no mundo, sendo usado em mais de 230 laboratórios em 41 países ([www.oeps.tech](http://www.oeps.tech)), esse é um passo importante para ampliar o acesso à ferramenta desenvolvida e que contribui para a reprodutibilidade dos experimentos baseados na detecção de *ripples*.

Na próxima parte deste trabalho, o módulo de detecção de *ripples* desenvolvido e integrado ao sistema de estimulação em malha fechada é utilizado em experimentos de perturbação de *ripples* durante o sono pós-aprendizado no labirinto de Barnes.

Figura 8 – GUI do Open Ephys, com destaque para a janela que disponibiliza a instalação do *plugin* de detecção de *ripples*



Fonte: elaborada pelo autor.

## Parte II

Perturbação de *ripples* durante o sono pós-aprendizado no labirinto de Barnes

## 6 II: Introdução

O sistema de detecção de *ripples* desenvolvido e validado na Parte I é essencial para que os experimentos de intervenção seletiva na atividade de populações neuronais sejam executados. Em especial, o uso integrado do *plugin* ao sistema de registro e estimulação em malha fechada permite investigar, por meio da perturbação de SWRs, o envolvimento causal desses eventos oscilatórios na formação de memória do labirinto de Barnes durante o sono.

A ideia de que a perturbação de SWRs poderia prejudicar a consolidação da memória durante o sono passa pelo entendimento de sua estreita relação como fenômeno de *replay* (ver seção 1.6). Suprimir os eventos de SWRs resultaria na interrupção do *replay* subjacente e, conseqüentemente, na perturbação dos mecanismos de plasticidade que contribuem para a distribuição e a estabilização dos traços de memória em regiões corticais. Nesse contexto, [Buzsáki \(2015\)](#) aponta que

“[...] talvez a mais importante característica das SWRs seja seu conteúdo de *spikes*. Apesar de sua aparência supersíncrona, neurônios que participam dos eventos de SWRs são sequencialmente organizados e a estrutura ordenada desses eventos reflete uma versão temporalmente comprimida dos padrões sequenciais de disparos neuronais no animal desperto.”<sup>1</sup>

Em consonância com o modelo de formação de memória em dois estágios, [Buzsáki \(2015\)](#) propõe que, em um primeiro momento, durante o aprendizado na vigília, a atividade aferente oriunda do neocórtex/córtex entorrinal cause alterações transientes dos pesos sinápticos nas regiões de CA3, do hipocampo, onde a informação aprendida é temporariamente armazenada. Em um segundo momento, durante períodos de comportamento consumatório e no sono de ondas lentas, as *sharp-waves* originadas espontaneamente em CA3 e a formação subsequente do complexo SWR são responsáveis por transferir a informação recém-adquirida do hipocampo para o neocórtex. Enquanto isso, os repetidos eventos de SWR continuam a potencializar as mesmas sinapses que deram origem às mudanças sinápticas durante o processo de aprendizado. Curiosamente, ainda que as SWRs não ocorram exclusivamente no sono, aquelas registradas durante a vigília não parecem estar envolvidas na consolidação de memória, mas em funções complementares, tais como a tomada de decisão guiada pela memória ([FOSTER; WILSON, 2006](#); [DIBA; BUZSÁKI, 2007](#); [CARR; JADHAV; FRANK, 2011](#); [JADHAV et al., 2012](#); [GIRARDEAU; CEI; ZUGARO, 2014](#); [DECEUNINCK; KLOOSTERMAN, 2024](#)).

<sup>1</sup> “[...] perhaps the most important feature of SPW-Rs is its spike content. Despite its super-synchronous appearance, neurons participating in SPW-R events are sequentially organized and the orderly structure of these events reflects a temporally compressed version of the sequential neuronal firing patterns in the waking animal.”

Estudos de interrupção de *ripples* durante o sono relatam efeitos deletérios na formação de memória (GIRARDEAU et al., 2009; EGO-STENGEL; WILSON, 2010; ALEMAN-ZAPATA; MORRIS; GENZEL, 2022), mas nenhum deles verificou a relevância desses eventos para a consolidação no labirinto de Barnes, especificamente. Além disso, não foram feitos experimentos que buscassem diferenciar os possíveis efeitos sobre memória remota e memória recente. A realização de experimentos desse tipo tem como motivação a ideia de que alterações no sono podem gerar efeitos tardios na cognição, imperceptíveis no tempo presente, como alguns trabalhos têm sugerido (BLACKWELL et al., 2014; LENG et al., 2024).

Nesse sentido, a proposta desta Parte II do trabalho é realizar experimentos de perturbação das SWRs durante o sono após o aprendizado no labirinto de Barnes e avaliar, em momentos distintos, seus possíveis efeitos na consolidação da memória espacial. Atestar a participação das SWRs no diálogo hipocampo-córtex por trás do aprendizado nessa tarefa é também um importante passo antes de se prosseguir com experimentos futuros de perturbação cortical durante delta e *spindle*.

## 7 II: Objetivos

Para testar a hipótese de que a perturbação de *ripples* durante o sono pós-aquisição prejudica a consolidação de memória espacial da tarefa do BM, os seguintes objetivos foram estabelecidos:

- 1) realizar experimentos de interrupção seletiva de *ripples* por estimulação elétrica durante as primeiras horas do sono subsequente ao treinamento no labirinto;
- 2) analisar o desempenho do grupo submetido à supressão de *ripples* e compará-lo com o de animais controle não implantados;
- 3) investigar possíveis alterações na estrutura do sono decorrentes da estimulação elétrica;
- 4) quantificar a ocorrência de *ripples* antes e após a exposição à tarefa, bem como avaliar a eficácia do protocolo de interrupção dessas oscilações.

## 8 II: Métodos

### 8.1 Sujeitos experimentais

Foram utilizados 14 ratos Wistar machos adultos com peso entre 300g e 340g provenientes do Centro de Bioterismo do ICB-UFMG (CEBIO), sendo 8 pertencentes ao grupo controle (animais *naïve*, não implantados) e 6 ao grupo em que houve perturbação de *ripples*. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Laboratório Institucional de Neurociências Molecular e Comportamental (LANEC) da UFMG sob um ciclo claro/escuro com alternância a cada 12 horas (início do ciclo claro às 7h). A temperatura do biotério era regulada entre 20 °C e 25 °C. As caixas de polipropileno em que os animais foram acomodados possuíam dimensões de 41 x 34 x 18 cm e o assoalho era coberto por maravalha. Objetos de diferentes texturas e formatos, tais como tubulações de PVC e anéis de madeira, eram constantemente introduzidos na caixa como fatores de enriquecimento ambiental. Os animais receberam água e ração balanceada *ad libitum* antes e durante todo o período experimental, além de serem submetidos diariamente ao protocolo de *handling* por 10 minutos, pelo menos, para habituação com os experimentadores, com os movimentos de preparação cirúrgica e com o deslocamento até os locais de experimentação e/ou registro. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo 41/2017.

### 8.2 Cirurgia estereotáxica

Os 6 animais do grupo de perturbação de *ripples* foram submetidos ao procedimento de cirurgia estereotáxica, sob anestesia, para implantação de eletrodos de registro eletrofisiológico e estimulação elétrica.

#### 8.2.1 Anestesia

Os componentes usados para a anestesia geral foram a cetamina (cloridrato de cetamina 10%, diluído em veículo estéril q.s.p.) e a xilazina (cloridrato de xilazina 2%, diluído em veículo estéril q.s.p.), aplicadas por via intraperitoneal ou intramuscular. A dosagem padrão foi calculada de acordo com o peso do animal e era composta por 1 mL/kg de cetamina e 0,5 mL/kg de xilazina. A primeira administração foi feita por via intraperitoneal contendo 70% da dose (0,7 mL/kg de cetamina e 0,35 mL/kg de xilazina), seguida por uma aplicação intramuscular complementar de 50% da dose (0,5 mL/kg de cetamina e 0,25 mL/kg de xilazina) após 10 minutos. A profundidade da anestesia era continuamente monitorada durante a cirurgia pela verificação da ausência de atividade

motora espontânea ou oriunda de reflexos, elicitados por meio do pinçamento da cauda e das patas traseiras. Administrações complementares de 30% de cetamina pela via intraperitoneal foram realizadas ao longo do procedimento cirúrgico conforme a resposta do animal. Adicionalmente à anestesia geral, foi aplicado cerca de 0,1 mL de lidocaína (cloridrato de lidocaína 2% e bitartarato de epinefrina 0,001% diluídos em veículo aquoso estéril q.s.p.) para anestesia local do escalpo antes da incisão.

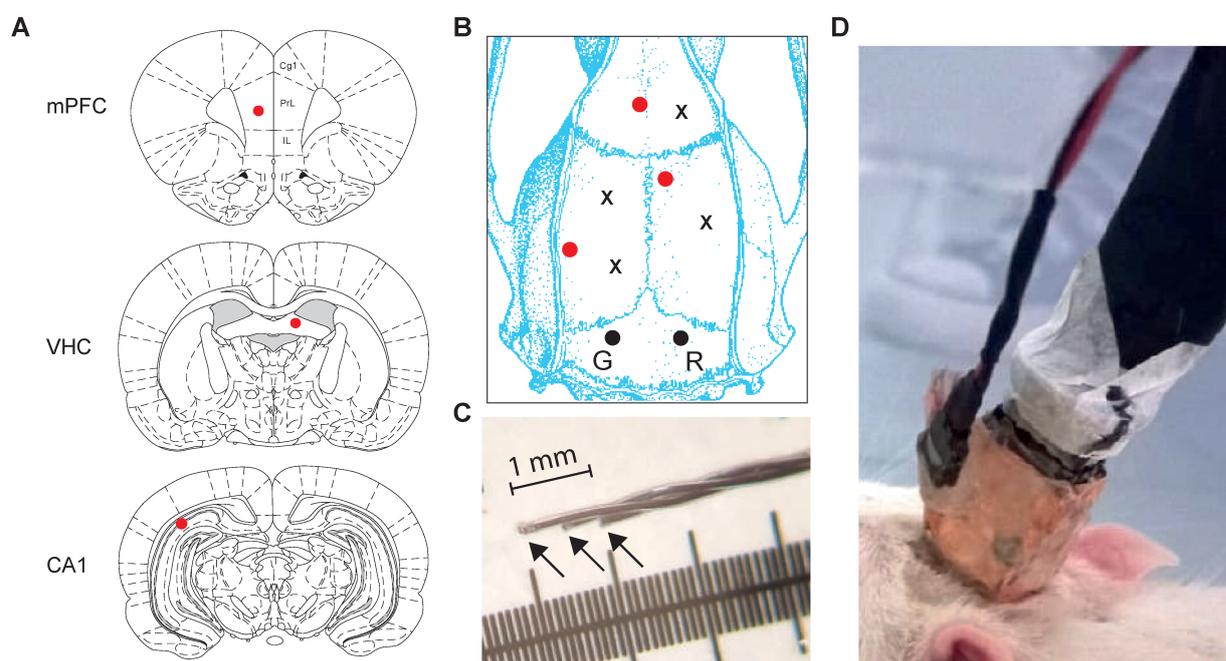
### 8.2.2 Cirurgia estereotáxica e implante dos eletrodos

Após a etapa de anestesia geral do animal foi realizada a tricotomia do escalpo e a fixação da cabeça no aparelho estereotáxico (Bonther, Brasil). Durante toda a cirurgia, a temperatura corporal foi monitorada com um termômetro retal e mantida em torno de 37 °C por meio de uma manta térmica posicionada sob o animal. Além disso, os olhos foram mantidos hidratados com gel oftálmico e protegidos da incidência direta de luz. Em seguida, foi realizada a assepsia do escalpo com iodopovidona 10% e aplicada lidocaína por via subcutânea, entre o crânio e o escalpo. A superfície do crânio foi então exposta a partir de uma incisão de aproximadamente 1,5 cm próxima da linha medial da cabeça, no sentido ântero-posterior (AP), seguida pela remoção do tecido conjuntivo com peróxido de hidrogênio 3%.

O crânio do animal foi nivelado de modo que a diferença entre as coordenadas de Bregma e Lambda no eixo dorso-ventral (DV) não ultrapassasse 0,1 mm. As coordenadas de Bregma nos eixos AP e médio-lateral (ML) serviram como referência para a realização de craniotomias que permitiram a inserção de eletrodos nos seguintes alvos: região pré-límbica do mPFC: AP = +3,0, ML = -0,5, DV = -3,5 mm; região de CA1 do hipocampo dorsal: AP = -5,4, ML = -4,6, DV = -2,3 mm; comissura do hipocampo ventral (VHC, do inglês, *ventral hippocampal commissure*): AP = -1,3, ML = +1,0, DV = -3,8 mm (Figura 9A) (PAXINOS; WATSON, 2009). Adicionalmente, foram realizadas outras 6 craniotomias para a fixação de parafusos (1,6 mm de diâmetro) no crânio, sendo 2 no osso occipital, para aterramento e referência, e 4 nos ossos parietal e frontal, para suporte da estrutura do conector (Figura 9B). Os parafusos de aterramento e referência foram ligados ao conector do implante por meio de fios de prata (diâmetro de 0,381 mm; A-M Systems, EUA).

Durante o procedimento de posicionamento dos eletrodos, os respectivos registros de LFPs eram feitos em tempo real para auxiliar na aproximação até os alvos. Os eletrodos foram confeccionados com fios de tungstênio revestidos por Teflon (diâmetro de 76,2 µm sem revestimento e 114,3 µm com revestimento; A-M Systems, EUA). No mPFC foi inserido 1 fio de tungstênio, enquanto que na comissura e na região de CA1 foram inseridos 2 e 3 fios trançados, respectivamente. Em particular, as extremidades dos 3 fios que formavam o eletrodo de CA1 foram espaçadas em 500 µm, aproximadamente, de modo

Figura 9 – Referências para o posicionamento dos eletrodos durante a cirurgia estereotáxica e detalhes da construção do implante. (A) Os pontos vermelhos marcam as regiões-alvo para registro eletrofisiológico (mPFC, CA1) e estimulação elétrica (VHC). (B) Mapa de localização das craniotomias. Pontos vermelhos: inserção de eletrodos; pontos pretos: parafusos de aterramento (G) e referência (R); marcações em “x”: parafusos para estabilidade e suporte do implante. (C) Detalhe do eletrodo inserido na região de CA1, do hipocampo. Os 3 fios individuais trançados possuem suas extremidades espaçadas em cerca de 500  $\mu\text{m}$ . (D) Imagem do implante finalizado. A fita de cobre atua como uma gaiola de Faraday, revestindo os eletrodos de registro e separando-os do eletrodo de estimulação, que possui um conector próprio. Conectados ao implante estão os fios para estimulação, à esquerda, e o *headstage*, à direita.



Fonte: (A) e (B) adaptadas de Paxinos e Watson (2009); (C) e (D) elaboradas pelo autor.

que a distância entre a extremidade mais superficial e a mais profunda fosse de 1 mm (Figura 9C). Um fio de tungstênio também foi colocado no músculo da região occipital posterior para registro do EMG.

Após serem posicionados na região de interesse, os eletrodos foram fixados no crânio com resina acrílica autopolimerizante e conectados aos terminais do implante. Uma fita de cobre em contato com o parafuso de aterramento foi usada para isolar os eletrodos de registro do de estimulação e, conseqüentemente, reduzir o ruído durante o registro (Figura 9D). Após o término da cirurgia, os animais foram hidratados com aplicação subcutânea de 1,6 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,9%). Também receberam aplicação de 0,2 mL de pentabiótico intramuscular e de 0,5 mL/kg de anti-inflamatório por via subcutânea (Banamine; 5 mg/mL). Antes de serem submetidos aos experimentos, todos os animais passaram por um período de recuperação cirúrgica de, no mínimo, 7

dias.

### 8.3 Lesão eletrolítica, extração e fixação dos encéfalos

Após passarem pelo protocolo experimental, os animais tiveram seus encéfalos removidos para verificação do posicionamento dos eletrodos. Para isso, os animais foram inicialmente anestesiados com cetamina e xilazina (70% da dose por via intraperitoneal) e, após confirmada a ausência de reflexos, submetidos à lesão eletrolítica no encéfalo por meio dos eletrodos implantados. A lesão, que auxilia na identificação do posicionamento dos eletrodos, é formada pela aplicação de um pulso simples de corrente contínua com duração de 1 s e amplitude de 1 mA. Em seguida, os animais receberam uma sobredose de cetamina e xilazina (300% a 500% da dosagem anestésica padrão por via intraperitoneal) e, após verificada a ausência de reflexo, foram submetidos ao procedimento de perfusão intracardíaca (ventrículo esquerdo) para fixação do tecido. A perfusão foi feita com 250 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês, *phosphate-buffered saline*) seguida por 250 mL de paraformaldeído (PFA) 4%.

Logo após a extração, os encéfalos foram submersos em solução de PFA por 24 horas e, nos dias seguintes, transferidos para solução de sacarose a 15% e a 30%, nessa ordem, permanecendo em cada uma por 24 horas. Por fim, foram congelados por submersão em isopentano a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 s e então armazenados em um freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até que fossem fatiados no criostato.

### 8.4 Histologia

Os encéfalos congelados foram levados ao criostato do CAPI (Centro de Aquisição e Processamento de Imagens - ICB/UFMG) e seccionados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em fatias de  $50\text{ }\mu\text{m}$  de espessura para que fosse possível identificar as regiões onde os eletrodos foram posicionados. As fatias próximas das regiões-alvo foram transferidas para lâminas previamente gelatinizadas e passaram por um procedimento de coloração com cresil violeta. Em resumo, o protocolo de coloração consiste em imersões sequenciais de 3 minutos de duração nas seguintes soluções: etanol a 100%, 90%, 80%, 70% e 50%, nessa ordem; água filtrada; solução de cresil violeta (tempo suficiente para ocorrer a coloração); água destilada; etanol 100%; etanol 100% + xilol 100% (1:1); xilol 100%. Em seguida, as lâminas foram montadas com lamínulas e meio de montagem (Permount). Por fim, foram armazenadas em freezer  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até que fossem encaminhadas para o *scanner* de lâminas do CAPI ICB/UFMG, onde tiveram suas imagens capturadas para posterior identificação do local das lesões.

## 8.5 Labirinto de Barnes

### 8.5.1 Aparato experimental

O aparato do labirinto consistiu em uma plataforma circular de madeira com 120 cm de diâmetro suspensa a 150 cm do chão por um pedestal também de madeira (Figura 10A). Na periferia da plataforma, a 5 cm da borda, havia 12 orifícios (10 cm de diâmetro cada) equidistantes e simetricamente posicionados no labirinto, sendo que apenas um deles dava acesso a uma caixa de escape. Os outros eram “falsas saídas”, tampadas por baixo com uma placa de MDF recoberta por fórmica preta que impedia o acesso à parte inferior da plataforma. A caixa de escape possuía dimensões de 17 x 23 x 11 cm e tinha o piso e as paredes internas recobertos por um plástico transparente e resistente. Os animais se locomoviam em cima de uma superfície de borracha preta removível, que se ajustava ao formato do labirinto e era colocada sobre ele para facilitar a higienização após cada sessão.

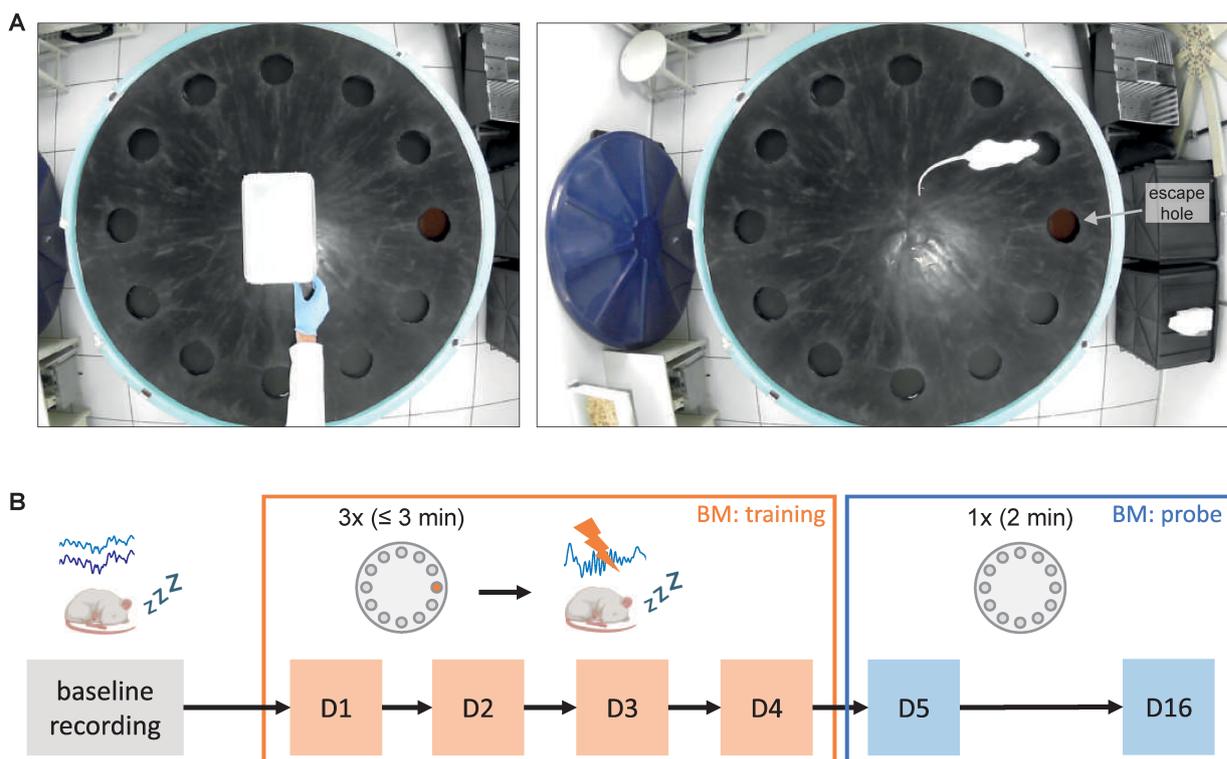
### 8.5.2 Local e condições de experimentação

O recinto do labirinto (3 x 3 m) era iluminado por 4 lâmpadas brancas de 45 W posicionadas nos cantos da sala e orientadas para as paredes. Além delas, havia uma lâmpada branca de 30 W posicionada no centro do labirinto a uma altura de 1,5 m acima da plataforma. A intensidade luminosa medida no centro da superfície do labirinto era de ~130 lux. Próximo às paredes da sala estavam afixadas pistas visuais estáveis de diferentes tamanhos, cores e formatos, tais como: cartaz, armário, televisor, mangueira, tampa de caixa d’água e outros. Essas pistas foram mantidas na mesma posição durante todas as etapas do teste, servindo como referências visuais para a construção do mapa espacial. O experimentador também permanecia imóvel dentro da sala durante todo o experimento e ocupava sempre a mesma posição. Todas as sessões foram gravadas por uma *webcam* (1920 x 1080 px, 30 fps) posicionada no teto da sala e conectada via USB ao computador de registro.

### 8.5.3 Protocolo experimental

Tanto os animais do grupo controle quanto os submetidos à perturbação de *ripples* realizaram a tarefa do labirinto de Barnes. Os experimentos no BM compreenderam 6 dias não consecutivos e foram divididos em duas etapas: aquisição (ou treino) e teste (Figura 10B). Todas as sessões tiveram início entre 8h e 9h e, antes do início dos experimentos, o animal era retirado do biotério em sua caixa e colocado na sala do labirinto, onde permanecia por 10 minutos para habituação. Na etapa de aquisição, que compreendeu os 4 primeiros dias (D1 a D4), o animal era colocado em uma caixa plástica retangular opaca (29 x 18 x 13 cm) e então posicionado no centro do labirinto com a caixa sobre ele.

Figura 10 – Protocolo experimental do labirinto de Barnes. **(A)** Imagens de uma sessão de treino (aquisição) no labirinto. A suspensão da caixa plástica opaca (esquerda) marca o início da sessão e o animal tem até 3 minutos para encontrar o buraco de escape (direita). **(B)** As sessões de treino (3 por dia) acontecem por 4 dias consecutivos (D1-D4). Nos dias D5 e D16 são realizadas sessões únicas de teste com duração de 2 minutos. No caso específico dos animais do grupo experimental (perturbação de *ripples*), os registros eletrofisiológicos acontecem um dia antes do início dos experimentos (registro de referência ou de linha de base) e durante os dias D1-D4, logo após a aquisição, quando há a interrupção das *ripples* por meio de estimulação elétrica.



Fonte: **(A)** elaborada pelo autor; **(B)** adaptada de Beraldo (2024); algumas imagens foram obtidas em [biorender.com](https://www.biorender.com).

A orientação da caixa era escolhida de modo pseudo-aleatório a cada sessão para evitar que ela se tornasse uma pista. Após 15 segundos, a caixa era removida manualmente pelo experimentador e ao animal era permitido explorar livremente o labirinto por 3 minutos ou até que entrasse na abertura de escape. O momento de remoção da caixa marcava o início da contagem de tempo da sessão. Caso não entrasse no escape antes desse intervalo, o animal era gentilmente conduzido até lá. Após permanecer dentro da caixa de escape por 1 minuto, ele era removido e colocado em sua caixa original, que ficava na sala do labirinto durante todo o período do experimento. Cada animal foi submetido a 3 sessões de aquisição por dia, espaçadas por um intervalo de 5 minutos. As posições do escape, do experimentador e da caixa trazida do biotério foram mantidas em todas as sessões de aquisição de todos os animais.

Na etapa de teste, realizada nos dias D5 e D16 (respectivamente, 24 horas e 12 dias após o fim da etapa de aquisição), os animais exploravam o labirinto por 2 minutos em uma única sessão diária. Nessa etapa, a caixa de escape foi removida e o orifício correspondente foi bloqueado por uma placa de MDF idêntica às utilizadas para tampar os demais orifícios. Como consequência, não havia nenhum escape disponível para o animal. Além disso, para evitar a orientação por possíveis pistas olfativas, a plataforma do labirinto foi rotacionada em 180° antes do início da sessão de teste.

Entre cada sessão de aquisição referente a um mesmo animal foi realizada a higienização com etanol 20% das seguintes áreas do aparato: interior da caixa de escape, superfície de borracha que cobria a plataforma, buracos do labirinto e a caixa plástica por meio da qual o animal era colocado no labirinto. Ao fim de uma sessão de teste ou das três sessões diárias de aquisição, as mesmas regiões do aparato foram higienizadas com etanol 70%. Esse procedimento de higienização buscava eliminar quaisquer pistas olfativas que estivessem presentes no labirinto, sejam as deixadas pelo mesmo animal durante a sessão anterior ou por animais diferentes que executaram o teste no mesmo dia.

#### 8.5.4 Breve epílogo metodológico: adaptações no protocolo do labirinto de Barnes

A primeira padronização da tarefa do labirinto de Barnes no laboratório foi realizada no trabalho de [Rêgo \(2014\)](#), cujos achados foram reproduzidos mais recentemente no trabalho de [Beraldo \(2024\)](#). Os autores submeteram cada animal a 4 sessões diárias do teste na etapa de aquisição. No quinto dia (D5), e apenas nele, foi realizada uma sessão de teste. No presente trabalho, duas modificações foram empregadas nesse protocolo: 1) a redução para 3 tentativas diárias na fase de aquisição e 2) a adição de uma sessão de teste no décimo sexto dia (D16, 12 dias após o fim da etapa de aquisição).

A razão da primeira modificação é a tentativa de induzir nos animais uma curva de aprendizado mais lenta em comparação com o protocolo anteriormente utilizado. Os resultados de [Rêgo \(2014\)](#) e [Beraldo \(2024\)](#) mostram que houve um avanço bastante pronunciado no desempenho dos animais entre o primeiro e o último dia de aquisição. Esse avanço ficou evidente pela redução da latência, da distância percorrida, dos erros primário e secundário e pelo aumento no uso da estratégia direta. No entanto, o que alguns trabalhos de supressão de *ripples* têm mostrado é que os prejuízos de aprendizado espacial não ocorrem de forma brusca e evidente logo a partir dos primeiros dias de intervenção ([GIRARDEAU et al., 2009](#); [EGO-STENGEL; WILSON, 2010](#); [JADHAV et al., 2012](#)). Em vez disso, o que se tem é uma curva de desempenho que vai se distanciando gradualmente da curva do grupo controle ao longo dos dias de treinamento. No caso do protocolo do BM usado anteriormente no laboratório, em que há um aprendizado bastante notável em um intervalo relativamente curto, pode ser que os possíveis efeitos da perturbação de

*ripples* não fossem observáveis no período de 4 dias que constitui a fase de aquisição. Por isso, na tentativa de aumentar a sensibilidade para detectar diferenças no desempenho dos animais sujeitos à intervenção, neste trabalho foram realizadas 3 sessões diárias de aquisição no labirinto.

A segunda modificação no protocolo do BM consiste na adição de uma sessão de teste 12 dias após o fim da aquisição (dia D16, na cronologia do protocolo). A ideia é avaliar a persistência de memórias espaciais mais remotas do labirinto após a intervenção seletiva no sono pós-treinamento. Uma das motivações para a inclusão de um dia extra de teste foi o fato de que poucos trabalhos com perturbação de *ripples* trazem análises sobre a manutenção da memória remota. Uma segunda razão, e que também justifica a escolha específica do dia D16, é poder comparar os resultados obtidos neste trabalho com os reportados por Binder et al. (2019). Os autores também avaliaram a memória no labirinto de Barnes nos dias D5 e D16 após uma intervenção durante o sono NREM pós-aprendizado, apesar de tal intervenção não ter se restringido apenas aos eventos de *ripples*.

## 8.6 Análise dos vídeos das sessões no labirinto de Barnes

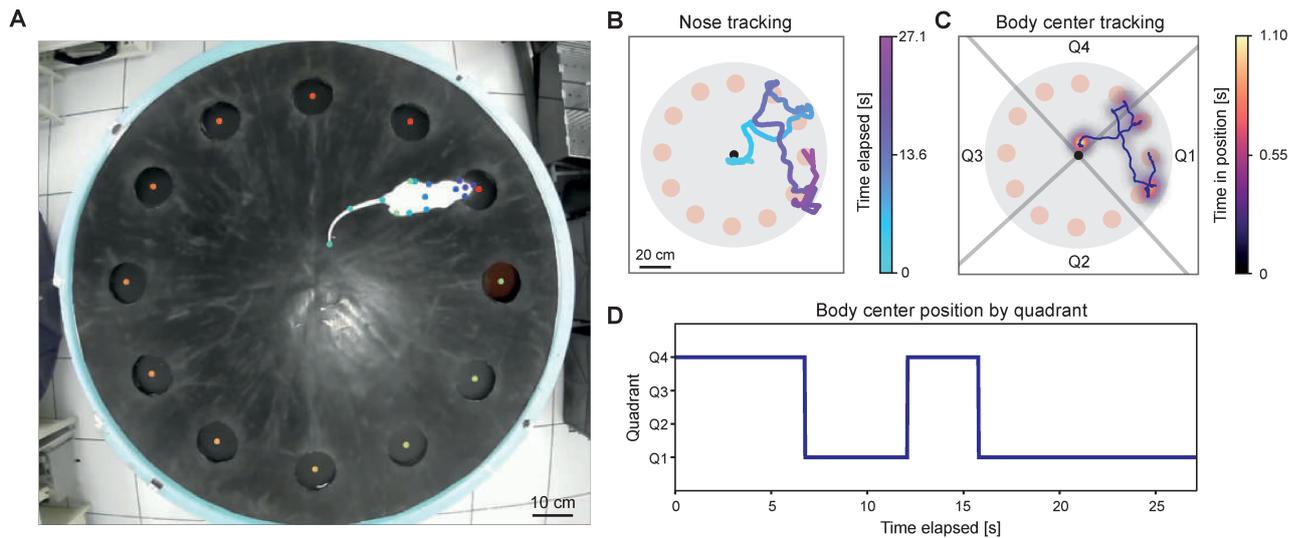
### 8.6.1 Pré-processamento dos vídeos

Os vídeos passaram por uma etapa de pré-processamento (*software* DaVinci Resolve 17) que consistia, principalmente, em delimitar e extrair apenas o intervalo compreendido entre o início e o fim das sessões do experimento. Considerou-se como início da sessão o último *frame* em que o animal estivesse dentro da caixa plástica de contenção (Figura 10A, quadro à esquerda). Já o fim da sessão foi definido por uma de duas condições possíveis: i) entrada total do animal no escape; ii) término do tempo de exploração (3 minutos para a aquisição ou 2 minutos para o teste). Por fim, os vídeos foram exportados em formato “mp4” com uma resolução de 1280 x 720 px e taxa de 30 fps.

### 8.6.2 Estimação automática de pose com o DeepLabCut

A partir dos vídeos pré-processados das sessões do BM foi possível estimar a pose dos animais com o DeepLabCut (DLC) v2.3.5 (MATHIS et al., 2018). O DLC é um *software* de código aberto que utiliza redes neurais artificiais profundas para identificar, automaticamente, as posições de diferentes partes do corpo do animal em cada *frame* do vídeo. A rede utilizada neste trabalho foi baseada na mesma rede treinada e descrita por Beraldo (2024). Trata-se de uma rede de topologia ResNet-50, inicializada com os mesmos parâmetros da rede usada por Beraldo (2024), mas adicionalmente treinada com 250 *frames* extraídos de 10 sessões no BM. O número total de iterações foi de  $1,55 \times 10^6$ .

Figura 11 – Estimação de pose usando o DeepLabCut e extração de parâmetros comportamentais. (A) Identificação dos orifícios do labirinto e de partes do corpo do animal pelo DeepLabCut. A obtenção das coordenadas *frame a frame* permite traçar a trajetória de diferentes partes do animal ao longo do experimento. (B) Trajetória do focinho durante uma sessão de aquisição. (C) Trajetória do centro do corpo durante a mesma sessão e tempo de permanência em cada ponto do labirinto. Cada um dos quadrantes (Q1-Q4) contém 3 orifícios distintos, sendo Q1 o quadrante onde se localiza o escape. (D) Posição do centro do corpo do animal por quadrante durante a sessão.



Fonte: elaborada pelo autor.

A rede foi treinada para identificar as coordenadas de cada um dos orifícios do labirinto e das seguintes partes do animal: focinho, cabeça, orelhas direita e esquerda, pescoço, centro do corpo, laterais esquerda e direita do corpo, base da cauda, meio da cauda e extremidade da cauda. Cada uma das sessões no BM foi avaliada pela rede treinada e, ao fim do processo, o DLC gerou um arquivo no formato HDF5 (do inglês, *Hierarchical Data Format v5*) com as coordenadas *frame a frame* de cada parte (Figura 11A).

### 8.6.3 Extração de métricas comportamentais

Em posse do arquivo HDF5 contendo as coordenadas *frame a frame*, foi utilizado um conjunto de códigos desenvolvidos na linguagem Python para obter a trajetória dos animais e calcular as seguintes métricas de desempenho na tarefa: i) tempo necessário para encontrar o escape pela primeira vez (latência primária); ii) quantidade de falsas saídas visitadas antes de encontrar o escape, podendo variar de 0 até 11 (erro primário); iii) número de revisitas a falsas saídas previamente visitadas (erro secundário); iv) distância percorrida até o encontro do escape (distância primária); v) velocidade média na sessão até o encontro do escape; vi) tipo de estratégia de orientação utilizada para encontrar o

escape; vii) número de vezes em que cada orifício foi visitado (ou, do inglês, *head dips*); viii) percentual do tempo da sessão despendido nos diferentes quadrantes do labirinto. Cada quadrante compreende três orifícios, sendo o quadrante-alvo aquele que compreende o orifício de escape e seus vizinhos diretos (Figura 11C). As Figuras 11B, C e D apresentam exemplos de trajetórias obtidas a partir dos dados gerados pelo DeepLabCut e analisados por meio de códigos em Python. As coordenadas do focinho foram usadas para os cálculos de latência primária, dos erros primário e secundário, da quantidade de vezes em que cada abertura foi explorada e para a identificação da estratégia de orientação. Já as coordenadas do centro do corpo foram usadas para cálculo da distância total percorrida, da velocidade média e do tempo de permanência em cada quadrante.

A estratégia utilizada para encontrar o escape em cada sessão foi classificada como direta (espacial), serial ou aleatória. Os critérios de classificação foram: 1) estratégia direta: deslocamento até o escape ou até um de seus vizinhos diretos imediatamente antes do escape; 2) estratégia serial: exploração sequencial de saídas adjacentes no sentido horário ou anti-horário antes de encontrar o escape; pelo menos 75% da exploração deve ocorrer dessa maneira para que seja classificada como serial; 3) estratégia aleatória: qualquer comportamento exploratório que não tenha sido classificado nas demais estratégias.

Para calcular algumas dessas métricas, há autores que consideram o momento de entrada no escape como o marcador do fim da sessão (RêGO, 2014; NEGRÓN-OYARZO et al., 2018; BINDER et al., 2019). No entanto, conforme explicado por Gawel et al. (2019), é comum que alguns animais percam a motivação para entrar na caixa de escape depois de algumas sessões de aquisição. Isso ocorre porque eles se familiarizam com o ambiente aversivo de alta luminosidade do labirinto. Muitos começam uma nova sessão se direcionando até o local do escape, posicionando a cabeça no escape como forma de garantir que ele ainda esteja lá e, em vez de entrarem logo em seguida, preferem explorar o restante do labirinto. Portanto, considerar como término da sessão o momento de entrada no escape pode afetar algumas das métricas de desempenho e levar a interpretações equivocadas dos resultados. Conforme recomendado e aplicado em vários outros estudos (por exemplo, Harrison et al. (2006), Locklear e Kritzer (2014), Gawel et al. (2019)), neste trabalho foi considerado como fim da sessão o momento em que o animal encontra o escape pela primeira vez.

Os códigos em Python usados para o cálculo das métricas de desempenho foram os mesmos desenvolvidos no trabalho de Beraldo (2024), os quais se encontram disponíveis em [github.com/ikaro-beraldo/barnes-maze-python-routines](https://github.com/ikaro-beraldo/barnes-maze-python-routines).

## 8.7 Registro e estimulação em malha fechada

### 8.7.1 Arquitetura de *hardware*

A arquitetura de *hardware* usada para registro e estimulação em malha fechada é semelhante à abordada na Parte I e está ilustrada na Figura 12. Os sinais eletrofisiológicos de CA1, do mPFC e do EMG são inicialmente filtrados, amplificados e digitalizados por um headstage Intan RHD2132. Os dados são então transmitidos para a placa de aquisição do Open Ephys via protocolo serial por meio de cabos SPI (do inglês, *serial peripheral interface*) (SIEGLE et al., 2017). O sistema de aquisição do Open Ephys é conectado via USB a um computador com processador Intel Core i5-7400 3.00 GHz, 16 GB de memória RAM e sistema operacional Windows 10. Nesse computador está instalada a GUI do Open Ephys, por meio da qual são feitas a configuração do fluxo dos dados e a detecção de *ripples* em tempo real. Os comandos de estimulação gerados a partir da detecção de *ripples* são transmitidos via USB ao Pulse Pal (Sanworks), um dispositivo gerador de pulsos, que faz interface com um estimulador S88 (Grass Instrument) responsável pela geração da tensão elétrica de estimulação. A saída do Pulse Pal também é enviada de volta ao sistema de aquisição por meio de uma placa entrada/saída para registrar o momento em que a estimulação de fato ocorreu. Por fim, os pulsos de tensão são convertidos em pulsos de corrente por um isolador óptico PSIU6 (Grass Instrument) e aplicados ao animal.

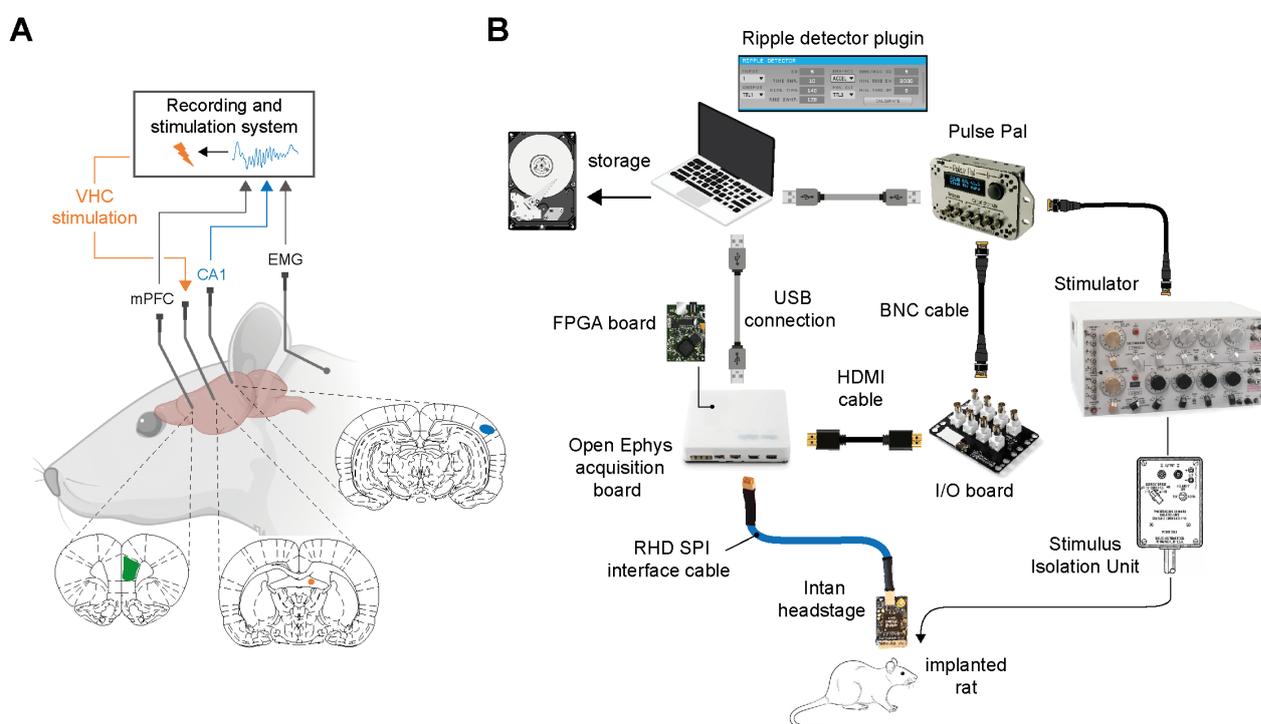
### 8.7.2 Registro eletrofisiológico

Os sinais eletrofisiológicos do mPFC (1 canal), da região de CA1 do hipocampo (3 canais) e do EMG do músculo da região occipital posterior (1 canal) foram registrados a uma taxa de 30 kHz por 5 dias consecutivos: um dia antes do início dos experimentos no labirinto de Barnes (registro de linha de base ou de referência) e nos quatro dias seguintes, após as sessões de aquisição (dias D1-D4). Os registros começaram entre 9h e 10h, a depender do dia e do animal, e terminaram às 17h. Os animais foram registrados em uma caixa plástica de dimensões 20 x 30 x 40 cm, com o assoalho coberto por maravalha, e tinham acesso livre a água e ração. A sala de registro era separada dos outros recintos do laboratório e reservada exclusivamente para esse fim, não havendo a presença de nenhum outro animal além do que estava sendo registrado.

### 8.7.3 Detecção de *ripples* em tempo real e estimulação

A detecção de *ripples* em tempo real ocorreu durante as 4 primeiras horas de sono pós-aquisição no labirinto de Barnes (dias D1-D4). Ela foi feita por meio do *plugin* desenvolvido na Parte I e recebe, como entrada, o registro de um dos três canais do hipocampo filtrado na faixa de 100 Hz a 250 Hz. O canal escolhido variou de animal para animal, sendo selecionado aquele que exibia mais claramente os eventos de *ripples*

Figura 12 – Sistema para registro e estimulação em malha fechada. **(A)** Figura ilustrativa do posicionamento dos eletrodos de registro (mPFC, CA1 e EMG) e de estimulação (VHC). A detecção de *ripples* em CA1 dispara um comando para estimulação elétrica na VHC. **(B)** Esquema de *hardware* e *software* para estimulação em malha fechada. Inicialmente, os sinais eletrofisiológicos são pré-processados pelo headstage, que transmite os dados digitalizados para o sistema de aquisição do Open Ephys. Os registros são armazenados em memória não-volátil para análises posteriores. A GUI do Open Ephys executa em tempo real o *plugin* de detecção de *ripples* desenvolvido no escopo deste trabalho, que envia um comando para o Pulse Pal quando um evento de *ripple* é detectado. Na sequência, ao receberem o sinal do Pulse Pal, o estimulador e o isolador óptico geram um pulso de corrente elétrica que é aplicado na comissura do hipocampo ventral do animal. O sinal do Pulse Pal também é registrado de volta pelo sistema de aquisição para fins de análise.



Fonte: adaptada de Sousa et al. (2022) com imagens de diversas fontes: [https://stock.adobe.com/search?k=rat+drawing&asset\\_id=180482892](https://stock.adobe.com/search?k=rat+drawing&asset_id=180482892); [open-ephys.org](https://open-ephys.org/); [www.a-msystems.com/t-grass\\_stimulators.aspx](https://www.a-msystems.com/t-grass_stimulators.aspx); [intantech.com](https://intantech.com/); [biorender.com](https://biorender.com)

e/ou cujas características da sharp-wave associada indicassem maior proximidade com a camada piramidal. Os parâmetros de detecção foram: número de pontos para cálculo do RMS = 128; período refratário = 140 ms; limiar de amplitude = 4 desvios-padrão; limiar de tempo = 8 ms.

Por estar vinculada à detecção das *ripples*, a estimulação foi habilitada somente durante as 4 primeiras horas de sono nos dias D1-D4. Ela é disparada automaticamente a partir da detecção de um evento de *ripple* e foi aplicada por meio de um par de eletrodos trançados posicionados na VHC. Os pulsos de corrente contínua aplicados eram monofásicos, com 500  $\mu$ s de duração e amplitude mínima necessária para interromper as

*ripples* (entre 30  $\mu\text{A}$  e 300  $\mu\text{A}$ , a depender do animal; uma exceção foi o R5, cuja corrente aplicada foi de 500  $\mu\text{A}$ ). A intensidade da corrente de estimulação foi ajustada para cada animal no início do respectivo período de sono do dia D1.

Em paralelo à detecção de *ripples* estava habilitado o mecanismo de detecção de movimentação do animal, responsável por silenciar os comandos de estimulação durante os períodos de mais alta atividade motora. O propósito desse silenciamento é evitar que um artefato de movimento (mastigação, impacto do *headstage* contra a caixa de registro, etc.) fosse erroneamente interpretado como uma *ripple* e disparasse a estimulação. A identificação de movimento está incorporada ao *plugin* de detecção de *ripples* e foi feita com base no sinal de EMG filtrado na faixa de 100 Hz a 250 Hz. Os parâmetros de detecção eram ajustados no início do registro do dia D1 e variaram ligeiramente entre os animais, sendo, em linhas gerais: limiar de amplitude = 4 desvios-padrão; tempo mínimo em repouso para reabilitar a estimulação = 5 s; tempo mínimo em movimento para bloquear a estimulação = 30 ms.

## 8.8 Classificação dos estágios do ciclo sono/vigília

A classificação dos estágios do ciclo sono/vigília foi feita por meio de uma *toolbox* de código aberto desenvolvida pelo nosso grupo para análise da arquitetura do sono de roedores (MENDES, 2021) (disponível em [github.com/ikaro-beraldo/sleep-stages-classification](https://github.com/ikaro-beraldo/sleep-stages-classification)). Essa mesma *toolbox* foi amplamente usada em outros trabalhos do grupo para avaliar a estrutura do sono pós-aprendizado no labirinto de Barnes e no teste de localização de objetos, bem como em experimentos com manipulação farmacológica (REGO, 2022; POLANCZYK, 2023; BERALDO, 2024). Ela foi validada por meio da comparação com a classificação manual, atingindo níveis de eficácia acima de 90% (BERALDO, 2021). Desenvolvida em Matlab, a *toolbox* realiza o pré-processamento dos dados, divide o registro em trechos consecutivos de 10 segundos (épocas) e os classifica de forma semi-supervisionada como vigília, sono REM ou sono NREM. Neste trabalho, a classificação foi feita a partir do registro de EMG do músculo nugal e do LFP de um dos canais do hipocampo. O canal selecionado foi o mesmo escolhido para a detecção de *ripples*, considerando-se que seria o mais próximo da camada piramidal de CA1. As próximas seções descrevem brevemente o algoritmo de classificação empregado na *toolbox*.

### 8.8.1 Pré-processamento dos registros

Antes de serem submetidos ao algoritmo de classificação, os registros do LFP de CA1 e do EMG passam por uma etapa de pré-processamento no Matlab que inclui: i) reamostragem do sinal de 30 kHz para 1 kHz com a função *decimate*, que aplica um filtro passa-baixas antes da reamostragem para evitar *aliasing* (frequência de corte: 400 Hz); ii)

subtração da média do sinal (função *detrend*); iii) filtragem do LFP na faixa de 0,7 a 250 Hz e do EMG na faixa de 85 a 200 Hz; iv) separação do sinal em épocas de 10 segundos.

Nos registros de alguns animais houve a necessidade de um passo adicional de pré-processamento logo após a reamostragem, que consistiu na substituição do artefato de estimulação por uma interpolação linear. Essa substituição evitou que o artefato de estimulação, por vezes proeminente, gerasse uma classificação equivocada do estado do animal, seja pelo aumento do RMS do EMG ou pela alteração do perfil espectral do sinal de CA1. A interpolação iniciou-se no instante da aplicação do estímulo elétrico e cobriu uma janela de 300 ms adiante. Mesmo após esse tratamento, épocas que apresentassem alguma amostra cujo valor absoluto estivesse 12 desvios-padrão acima da média eram desconsideradas da classificação pela presença de artefato.

### 8.8.2 Cálculo de potência de banda e de RMS do EMG

Para cada época de 10 segundos do LFP foi calculada a densidade de potência espectral (PSD, do inglês, *power spectral density*) usando a função “pwelch” (HAYES, 1996) (comprimento da janela = 125 amostras, fator de sobreposição = 0, número de pontos da FFT = 2500). Em seguida, a potência de cada componente de frequência foi normalizada pela soma das potências de todas as componentes do sinal, sendo desconsiderada a soma daquelas na faixa de 58 a 62 Hz (frequência da rede elétrica). As potências na faixa de delta (1 a 4 Hz) e teta (5 a 12 Hz) foram somadas e a razão teta/delta foi obtida para cada uma das épocas.

No caso do EMG, o valor RMS de cada época foi calculado após a remoção dos componentes de frequência na faixa do sinal da rede elétrica (filtro “notch” nas bandas de 58 a 62 Hz, 118 a 122 Hz e 178 a 182 Hz). Esse procedimento evita que o ruído da rede elétrica interfira no cálculo do RMS.

### 8.8.3 GMM e classificação dos estados

A classificação dos estados é feita com base no modelo de misturas Gaussianas (GMM; do inglês, *Gaussian mixture model*), que atribui a cada amostra uma probabilidade de pertencer a um determinado *cluster* (REYNOLDS, 2009). As densidades de probabilidades são modeladas conforme distribuições Gaussianas, centralizadas nos *clusters* identificados no conjunto de dados. Neste trabalho os dados foram categorizados em 3 *clusters*, cada um correspondendo um diferente estado do animal: vigília, sono REM e sono NREM. Cada amostra do conjunto de dados representa uma época e as variáveis de entrada são o valor RMS do EMG e a razão teta/delta normalizados.

Na *toolbox*, o GMM foi implementado por meio da função *fitgmdist*, que recebe como argumento da posição inicial dos *clusters* os valores de média e covariância de curvas

Gaussianas extraídas previamente de um registro de referência (MENDES, 2021). Em outras palavras, foram classificadas manualmente todas as épocas do registro, ajustadas as curvas Gaussianas sobre os *clusters* formados e os parâmetros de tais curvas foram usados como valores iniciais para todos os outros registros futuros. A partir desses valores iniciais, a função *fitgmdist* determina os modelos de Gaussianas para o conjunto de dados a ser classificado. Cada época passa a ter, portanto, uma probabilidade associada de pertencer a cada um dos *clusters* (estados).

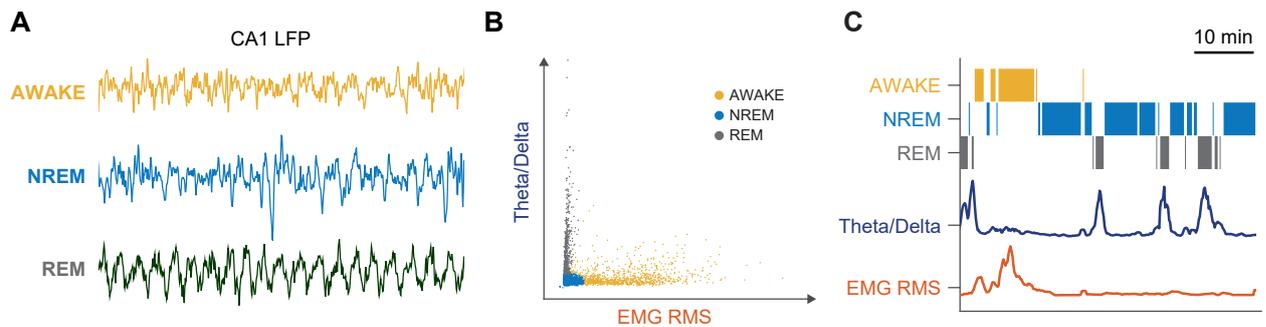
Ainda que os autores tenham treinado o algoritmo do GMM, é necessário realizar, antes de cada nova classificação, um processo supervisionado de identificação de 20 épocas em cada estado. Essa classificação manual feita pelo usuário é necessária para estabelecer o limiar de probabilidade a partir do qual uma época será considerada como pertencente a um determinado estado (limiar de probabilidade posterior). Para isso, a classificação feita pelo usuário é tomada como padrão-ouro e comparada com a classificação realizada de forma automática pelo GMM. Para cada estado são calculadas as taxas de verdadeiro positivo (TPR; do inglês, *true positive rate*) e falso positivo (FPR; do inglês, *false positive rate*) obtidas pelo GMM para diferentes valores de limiar de probabilidade posterior. Com essa relação de entrada (limiares de probabilidade posterior) e saída (TPR e FPR) é possível então determinar, para cada estado, o limiar que resultou no par (FPR,TPR) mais próximo do ponto (0,1); isto é: 0% de FPR e 100% de TPR. Portanto, épocas cujo valor de probabilidade posterior estejam acima desse limiar para um determinado estado são classificadas como parte desse mesmo estado.

Em linhas gerais, no que diz respeito ao resultado da classificação, épocas com alto valor de RMS do EMG e baixa ou moderada razão teta/delta foram classificadas como vigília; épocas com baixo valor RMS do EMG e alta razão teta/delta foram classificadas como sono REM e, por fim, épocas com baixo valor RMS do EMG e baixa razão teta/delta foram classificadas como sono NREM (Figura 13).

## 8.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio dos *softwares* R v4.3.3 e Graph-Pad Prism v9.5.0. Os testes estatísticos empregados variam de acordo com o tipo de comparação e a natureza dos dados. Em todos eles, considerou-se que as hipóteses nulas seriam rejeitadas quando o valor de p encontrado foi menor do que  $\alpha = 0,05$ . Os detalhes de cada teste e os resultados obtidos estão apresentados em tabelas ao longo do texto, logo após os gráficos com os respectivos dados. Em alguns casos foi utilizado o teste 2way art-ANOVA; mais detalhes sobre ele podem ser encontrados em Wobbrock et al. (2011).

Figura 13 – Classificação do ciclo sono/vigília. **(A)** Exemplos representativos do LFP da região de CA1 do hipocampo durante os estados de vigília, sono NREM e sono REM. **(B)** Identificação dos *clusters* correspondentes aos estados. Cada ponto do gráfico de dispersão representa uma época e é formado pelo valor RMS do EMG (abscissa) e pela razão teta/delta do LFP do hipocampo (ordenada). **(C)** Exemplo de um hipnograma gerado a partir da classificação de um trecho de registro. Estão indicados os valores RMS do EMG e a razão teta/delta do LFP do hipocampo no mesmo período.



Fonte: adaptada de Beraldo (2024).

## 8.10 Análise de eventos eletrofisiológicos

### 8.10.1 Detecção *offline* de *ripples*

A detecção *offline* de *ripples* foi realizada por meio de uma simulação em Matlab do *plugin* desenvolvido na Parte I deste trabalho. Essa simulação é a mesma utilizada na seção 3.1 do artigo publicado (Seção 4, Sousa et al. (2022)) e busca reproduzir todas as etapas do algoritmo de detecção em tempo real. Em resumo, os dados são disponibilizados ao algoritmo em blocos que simulam o *buffer*, os quais são filtrados na banda de *ripples* (100-250 Hz) por um filtro Butterworth de segunda ordem, semelhante ao implementado no bloco “Bandpass Filter”, da GUI do Open Ephys. Em seguida, os dados são divididos em sub-blocos e são calculados os valores RMS para cada um deles, de modo que constituam um “envelope” do sinal filtrado. A calibração do algoritmo, que consiste no cálculo da média e do desvio padrão dos valores RMS, é feita sobre os dados dos primeiros 20 segundos de registro. A partir disso, a detecção de um evento de *ripple* ocorre quando valores RMS consecutivos permanecem acima do limiar de amplitude de detecção (média + desvios-padrão) por um tempo mínimo (limiar de tempo).

Os parâmetros para detecção *offline* (limiar de amplitude e limiar de tempo) foram ajustados individualmente para cada animal, de modo a minimizar a diferença entre as detecções realizadas pelo *plugin* em tempo real, durante o período de estimulação, e as realizadas pela simulação do detector no mesmo período. De maneira geral, eles ficaram próximos daqueles utilizados durante a detecção em tempo real. Além desses parâmetros, o número de pontos para cálculo do RMS foi ajustado em 5, como forma de readequar o cálculo do contorno do sinal filtrado diante da frequência de reamostragem (1 kHz).

### 8.10.2 Cálculo de duração das *ripples*

A duração das *ripples* foi definida de maneira semelhante à descrita na seção 2.5 do artigo publicado (Seção 4, [Sousa et al. \(2022\)](#)). Inicialmente, o registro de LFP de CA1 (30 kHz) foi filtrado na banda de *ripples* (100-250 Hz) e o sinal resultante foi então elevado ao quadrado. Sobre o sinal ao quadrado foi calculada uma média móvel com um filtro FIR de fase zero, de ordem 1501, normalizada logo em seguida. A duração de cada evento de *ripple* é definida como o período em que a média móvel normalizada fica acima do limite de 5 (desvios-padrão).

## 9 II: Resultados e análises

### 9.1 Desempenho no labirinto de Barnes

Para estudar o aprendizado espacial dos animais foi utilizada a tarefa do labirinto de Barnes. Na etapa de aquisição, que compreende os dias D1-D4, os animais aprendem a localização do escape, que é testada posteriormente nos dias D5 e D16 (etapa de teste).

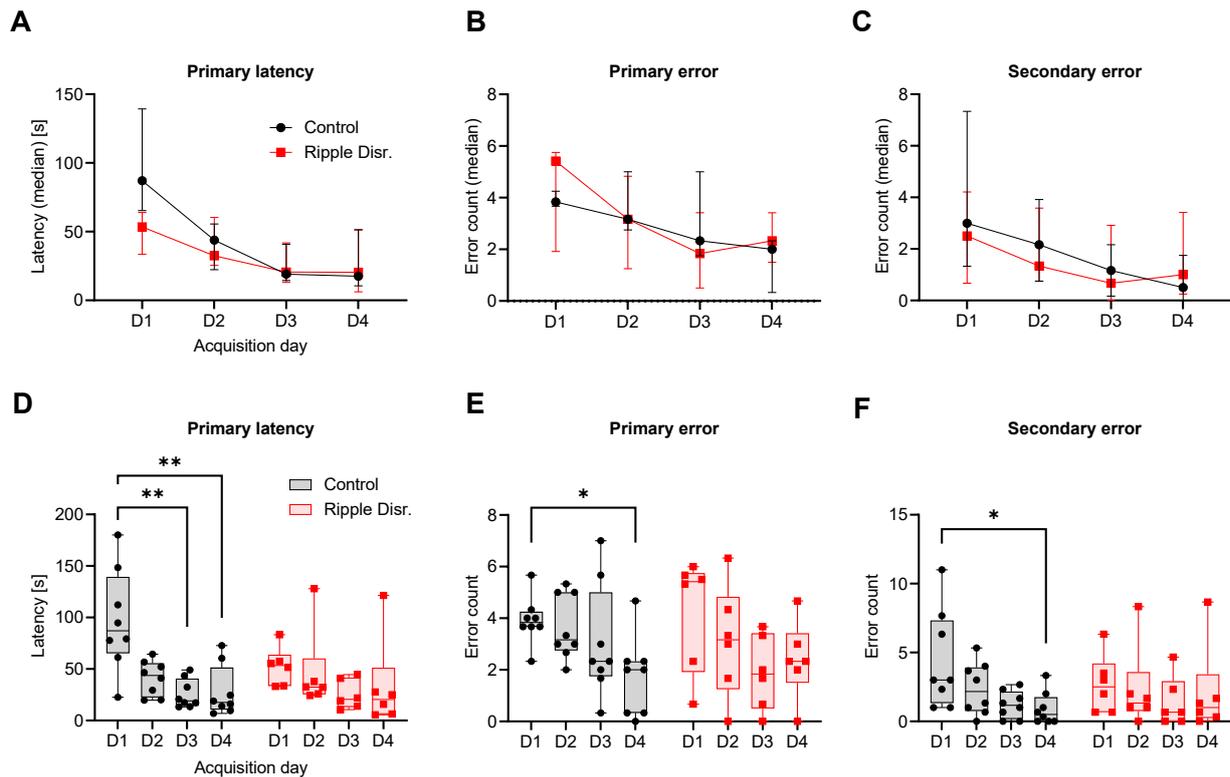
#### 9.1.1 Etapa de aquisição

Inicialmente, foram consideradas as seguintes métricas de desempenho para avaliar o aprendizado espacial dos animais ao longo dos dias de aquisição: latência para encontrar o escape, número médio de falsas saídas visitadas (erro primário) e número médio de revisitas a falsas saídas (erro secundário). A redução dessas métricas é um indício da formação de memória da posição do escape no labirinto. Uma comparação entre os grupos não foi capaz de evidenciar diferenças significativas entre eles no que diz respeito a esses parâmetros (Figuras 14A, B e C). No entanto, uma análise intragrupo revela que apenas os animais controle apresentaram redução de latência, de erros primários e de erros secundários em relação ao primeiro dia de aquisição (Figuras 14D, E e F, respectivamente). Os resultados dos testes estatísticos que embasam essas observações estão indicados na Tabela 1.

Ainda que não tenha sido encontrada diferença significativa entre as latências dos dois grupos no dia D1, é curioso notar que a mediana e a dispersão dos dados no grupo perturbação de *ripples* é menor que as do grupo controle nesse dia. É difícil atribuir algum motivo a essa diferença que não seja o procedimento cirúrgico, a colocação do implante ou a realização do registro de linha de base, já que as manipulações experimentais que distinguem os dois grupos só começaram após a realização da tarefa nesse dia. Interessantemente, um resultado semelhante foi encontrado por [Binder et al. \(2019\)](#), nesse caso entre o grupo *sham* (implantado, mas sem manipulação) e um grupo com inibição optogenética.

Em seguida, foram analisadas a velocidade média e a distância percorrida pelos animais no labirinto até o encontro do escape. Essas variáveis são importantes não só por indicarem um possível aprendizado, mas também porque servem como indicadores de capacidade locomotora. Animais com prejuízo de locomoção podem apresentar dificuldades para explorar o labirinto e, conseqüentemente, para aprender a tarefa, mesmo que tenham plenas condições cognitivas para tal. Além disso, alterações na velocidade e na distância percorrida também podem indicar comportamento do tipo ansioso ou ausência de motivação. Em se tratando dessas variáveis, não foram detectadas diferenças significa-

Figura 14 – Latência primária, erro primário e erro secundário durante os dias de aquisição no labirinto de Barnes. **(A)** Tempo médio despendido para encontrar o escape, **(B)** contagem média dos erros primários e **(C)** contagem média dos erros secundários até o encontro do escape (mediana  $\pm$  faixa interquartil). **(D)** Valores individuais de latência primária, **(E)** da contagem de erros primários e **(F)** da contagem de erros secundários (média das 3 tentativas ocorridas no dia). Os *box plots* indicam os valores mínimo e máximo, a mediana, o primeiro quartil e o terceiro quartil. Os testes estatísticos e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 1.

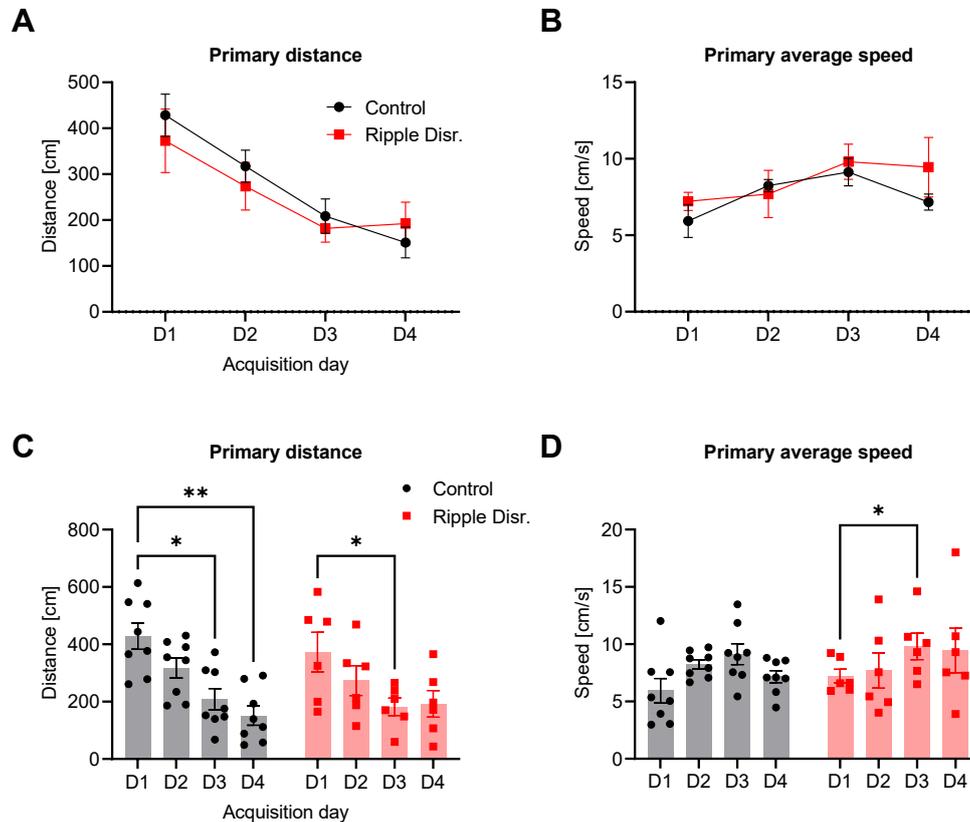


Fonte: elaborada pelo autor.

tivas entre os grupos ao longo dos dias de aquisição (Figuras 15A e B). Tanto os animais controle quanto os animais submetidos à perturbação de *ripples* apresentaram redução na distância percorrida (Figura 15C). No caso da velocidade média, o grupo controle não apresentou variações ao longo dos dias, enquanto que no grupo perturbação de *ripples* foi detectada uma diferença entre os dias D1 e D3 (Figura 15D). Os resultados dos testes estatísticos que embasam essas observações estão indicados na Tabela 2.

O ponto central do labirinto de Barnes não é apenas verificar a capacidade do animal de encontrar o escape, mas a eficiência com que o faz ao longo dos dias. Para um animal apto a realizar a tarefa plenamente, espera-se que ele encontre o escape cada vez mais rapidamente e que siga uma trajetória orientada, em oposição a realizar uma busca aleatória ou que se utilize de outros artifícios cognitivos que demandem menos da memória espacial. Nesse contexto, uma variável que permite inferir sobre o aprendizado

Figura 15 – Distância primária e velocidade média durante os dias de aquisição no labirinto de Barnes. **(A)** Distância percorrida e **(B)** velocidade média até o encontro do escape (média  $\pm$  erro padrão da média). **(C)** Valores individuais da distância percorrida e **(D)** da velocidade média (média das 3 tentativas ocorridas no dia). Os testes estatísticos e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 2.

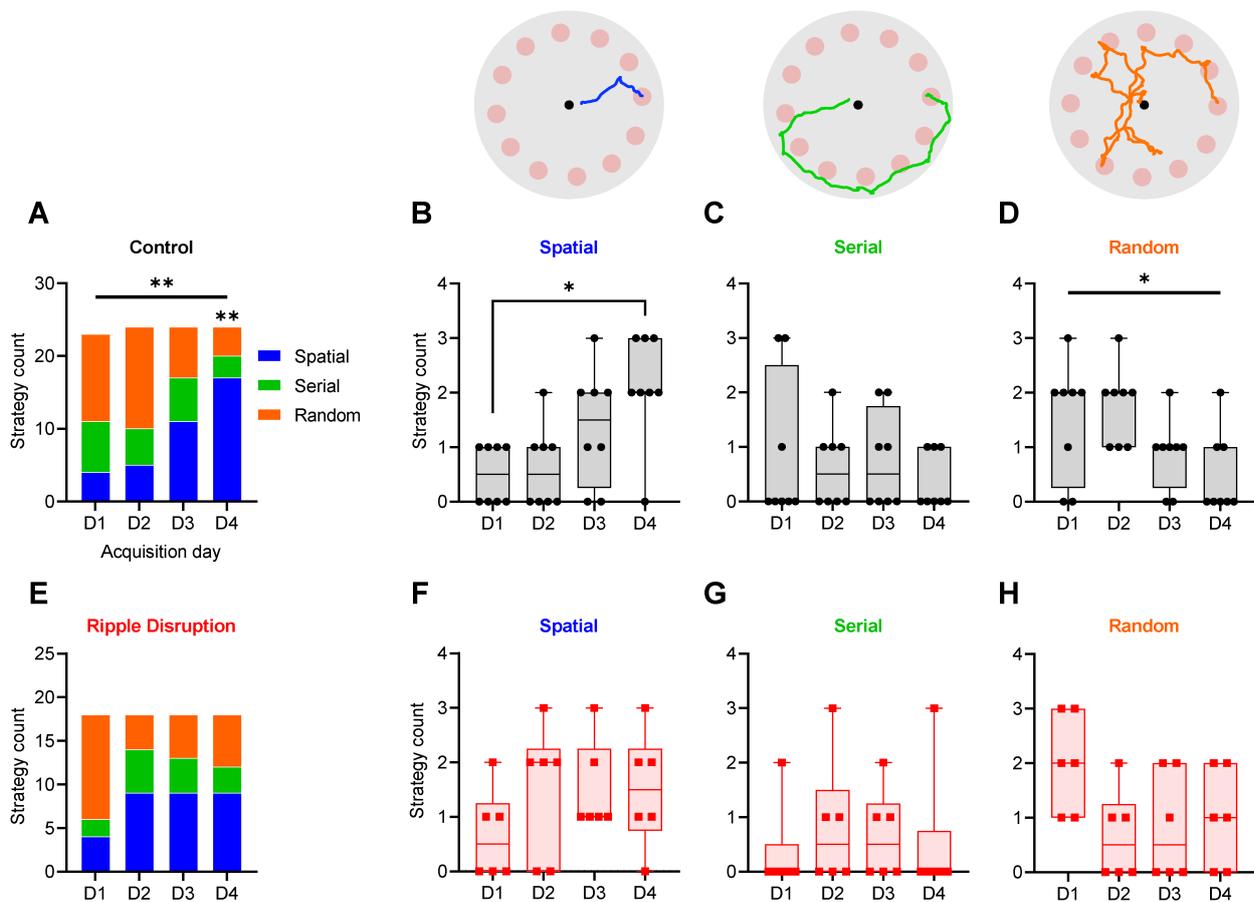


Fonte: elaborada pelo autor.

espacial dos animais é a estratégia utilizada para encontrar o escape. Três estratégias foram consideradas neste trabalho: espacial (ou direta), serial e aleatória (GAWEL et al., 2019). Na estratégia espacial, que indica um aprendizado espacial mais bem fundamentado, o animal se dirige diretamente ao orifício de escape ou a um de seus vizinhos diretos antes de encontrar o escape. Já na estratégia serial, o animal encontra um orifício diferente do escape e de seus vizinhos diretos e percorre uma trajetória sequencial até o escape, visitando orifícios adjacentes no sentido horário ou anti-horário. Por fim, na estratégia aleatória não há uma trajetória bem definida e as visitas aos orifícios são feitas de forma desorganizada.

A análise das estratégias utilizadas pelos animais revela que o grupo controle apresentou aumento no uso da estratégia espacial ao longo dos dias de aquisição, acompanhado de uma redução no uso da estratégia aleatória (Figuras 16A, B, C e D). Além disso, no D4, o uso da estratégia espacial foi significativamente predominante em relação ao uso

Figura 16 – Estratégias usadas para encontrar o escape durante a fase de aquisição no labirinto de Barnes. **(A)** Contagem total do número de sessões em que as estratégias espacial, serial e aleatória foram usadas pelos animais do grupo controle. **(B)** Valores individuais da contagem de sessões em que as estratégias espacial, **(C)** serial e **(D)** aleatória foram utilizadas pelos animais controle. **(E)** Contagem total do número de sessões em que as estratégias espacial, serial e aleatória foram usadas pelos animais do grupo perturbação de *ripples*. **(F)** Valores individuais da contagem de sessões em que as estratégias espacial, **(G)** serial e **(H)** aleatória foram utilizadas pelos animais submetidos à interrupção das *ripples*. Os *box plots* indicam os valores mínimo e máximo, a mediana, o primeiro quartil e o terceiro quartil. Os testes estatísticos e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 3.



Fonte: elaborada pelo autor.

das demais estratégias. Já no grupo submetido à perturbação de *ripples* a situação foi diferente: não foi observada diferença significativa entre os dias de aquisição quanto ao uso das estratégias. Os resultados dos testes estatísticos que embasam essas observações estão indicados na Tabela 3.

Em resumo, os resultados da etapa de aquisição no labirinto mostram que os animais com perturbação de *ripples* apresentaram uma evolução de desempenho reduzida em relação ao grupo controle. Na próxima seção são avaliados os impactos dessa diferença de

aprendizado na evocação da memória de localização do escape.

Tabela 1 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 14. Signif. = Significativo; Estim. = Estimativa; ns = não significativo; \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ ; # :  $p \leq 0,0001$

Figura	Teste	Fator/Comparação	Estatística	Valor $p$	Signif.?
A	2way art-ANOVA	Grupo	$F(1, 12) = 4,4671$	0,0562	ns
	2way art-ANOVA	Dia	$F(3, 36) = 10,7360$	<0,0001	#
	2way art-ANOVA	Grupo x Dia	$F(3, 36) = 2,3026$	0,0935	ns
B	2way art-ANOVA	Grupo	$F(1, 12) = 0,0001$	0,9914	ns
	2way art-ANOVA	Dia	$F(3, 36) = 6,5912$	0,0012	**
	2way art-ANOVA	Grupo x Dia	$F(3, 36) = 1,1684$	0,3353	ns
C	2way art-ANOVA	Grupo	$F(1, 12) = 0,4733$	0,5046	ns
	2way art-ANOVA	Dia	$F(3, 36) = 5,1659$	0,0045	**
	2way art-ANOVA	Grupo x Dia	$F(3, 36) = 0,6264$	0,6027	ns
D	Tukey	Controle: D1-D3	Estim. = 27,3750	0,0020	**
	Tukey	Controle: D1-D4	Estim. = 27,7500	0,0017	**
	Tukey	RippleDisr: D1-D2:D4	Estim. = $\leq 20,0000$	$\geq 0,1268$	ns
E	Tukey	Controle: D1-D4	Estim. = 21,938	0,0147	*
	Tukey	RippleDisr: D1-D2:D4	Estim. = $\leq 21,083$	$\geq 0,0684$	ns
F	Tukey	Controle: D1-D4	Estim. = 22,88	0,0282	*
	Tukey	RippleDisr: D1-D2:D4	Estim. = $\leq 12,83$	$\geq 0,7020$	ns

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 2 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 15. Signif. = Significativo; Dif. = Diferença; ns = não significativo; \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ ; # :  $p \leq 0,0001$

Figura	Teste	Fator/Comparação	Estatística	Valor $p$	Signif.?
A	RM 2way ANOVA	Grupo	$F(1, 12) = 0,3128$	0,5863	ns
	RM 2way ANOVA	Dia	$F(2, 151, 25, 81) = 13,21$	<0,0001	#
	RM 2way ANOVA	Grupo x Dia	$F(3, 36) = 0,5611$	0,6442	ns
B	RM 2way ANOVA	Grupo	$F(1, 12) = 0,7017$	0,4186	ns
	RM 2way ANOVA	Dia	$F(1, 979, 23, 75) = 4,126$	0,0293	*
	RM 2way ANOVA	Grupo x Dia	$F(3, 36) = 1,016$	0,3969	ns
C	Dunnett	Controle: D1-D3	Dif. média = 219,9	0,0339	*
	Dunnett	Controle: D1-D4	Dif. média = 277,2	0,0037	**
	Dunnett	RippleDisr: D1-D3	Dif. média = 190,7	0,0220	*
D	Dunnett	Controle: D1-D2:D4	Dif. média = $\leq -3,196$	$\geq 0,1114$	ns
	Dunnett	RippleDisr: D1-D3	Dif. média = -2,595	0,0307	*

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 16. Signif. = Significativo; Dif. = Diferença; Res. = Resíduo; ns = não significativo; \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ ; # :  $p \leq 0,0001$

Figura	Teste	Fator/Comparação	Estatística	Valor $p$	Signif.?
A	$\chi^2$	-	$\chi^2(6) = 20,15$	0,0026	**
	Bonferroni	D4: espacial	Res. = 3,7055	0,0025	**
B	Friedman	Dia	$Q = 13,25$	0,0041	**
	Dunn	D1 vs D4	Dif. = -14,50	0,0150	*
C	Friedman	Dia	$Q = 1,056$	0,7878	ns
D	Friedman	Dia	$Q = 9,643$	0,0219	*
	Dunn	D1 vs D2	Dif. = -4,000	>0,9999	ns
	Dunn	D1 vs D3	Dif. = 6,500	0,6244	ns
	Dunn	D1 vs D4	Dif. = 9,500	0,1975	ns
E	Teste exato de Fisher	-	-	0,0837	ns
F	Friedman	Dia	$Q = 4,765$	0,1982	ns
G	Friedman	Dia	$Q = 1,583$	0,7122	ns
H	Friedman	Dia	$Q = 6,667$	0,0787	ns

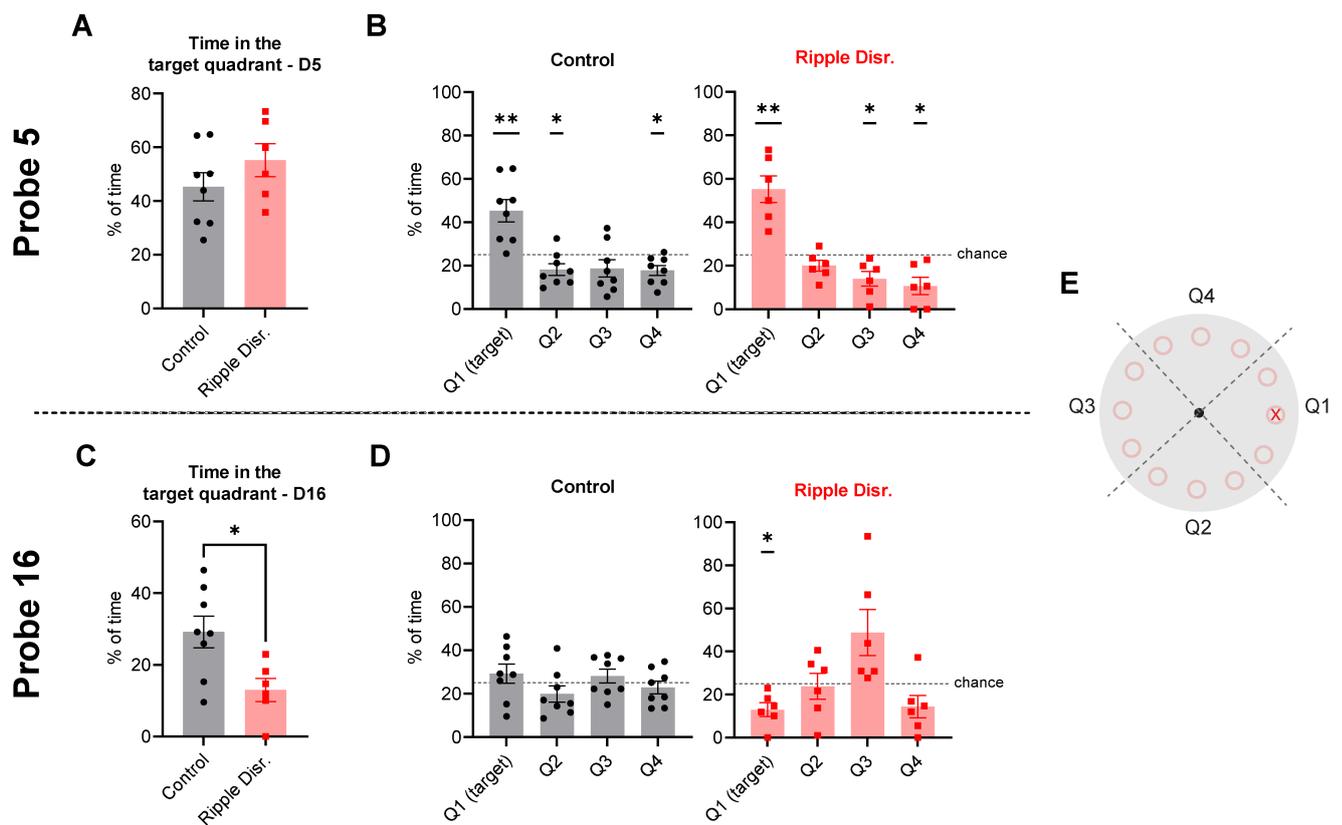
Fonte: elaborada pelo autor.

### 9.1.2 Etapa de teste

As sessões de teste da tarefa foram realizadas nos dias D5 e D16 para avaliar, respectivamente, a evocação 24 horas após a etapa de aquisição e após um período mais longo desde a última exposição ao labirinto. Foram analisados, inicialmente, o tempo em que cada grupo passou no quadrante onde antes havia o escape (quadrante-alvo). No dia D5 não foi encontrada diferença significativa entre os grupos no que diz respeito ao tempo de exploração do quadrante-alvo (Figura 17A). Ambos permaneceram nesse quadrante por mais do que 25% do tempo da sessão (Figura 17B); esse tempo corresponderia a uma situação em que os animais exploram igualmente cada um dos quadrantes. Além disso, o tempo de exploração do quadrante-alvo acima do nível do acaso é acompanhado por uma preferência por esse quadrante, já que nenhum outro teve um tempo de exploração acima de 25% (Figura 17B). Esses resultados sugerem que a interrupção das *ripples* não afetou a evocação de memória no dia D5.

Entretanto, algumas diferenças foram encontradas na sessão de teste do dia D16: a comparação entre grupos revela que os animais submetidos à perturbação de *ripples* exploraram o quadrante-alvo por menos tempo que os animais controle (Figura 17C). Enquanto o grupo controle apresentou indiferença em relação aos quadrantes no que diz respeito ao tempo de exploração, o grupo perturbação de *ripples* permaneceu, curiosamente, menos tempo que o nível do acaso no quadrante-alvo (Figura 17D). Esse mesmo grupo apresentou um tempo elevado de permanência no quadrante Q3, oposto ao quadrante-alvo, ainda que os testes estatísticos não tenham confirmado a preferência. Os resultados dos testes estatísticos que embasam essas observações estão indicados na Tabela 4.

Figura 17 – Tempo despendido em cada quadrante durante a etapa de teste no labirinto de Barnes. **(A)** Percentual do tempo despendido no quadrante-alvo para os grupos controle e perturbação de *ripples* nos dias D5 e **(C)** D16. **(B)** Valores individuais do tempo despendido em cada quadrante para cada grupo nos dias D5 e **(D)** D16. A linha tracejada indica o percentual de tempo de 25%. Em todos os gráficos, os pontos e/ou barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média. **(E)** Identificação do posicionamento de cada quadrante no labirinto. O orifício indicado com um “x” no quadrante Q1 (alvo) indica a posição do escape durante a etapa de aquisição. Os testes estatísticos e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 4.

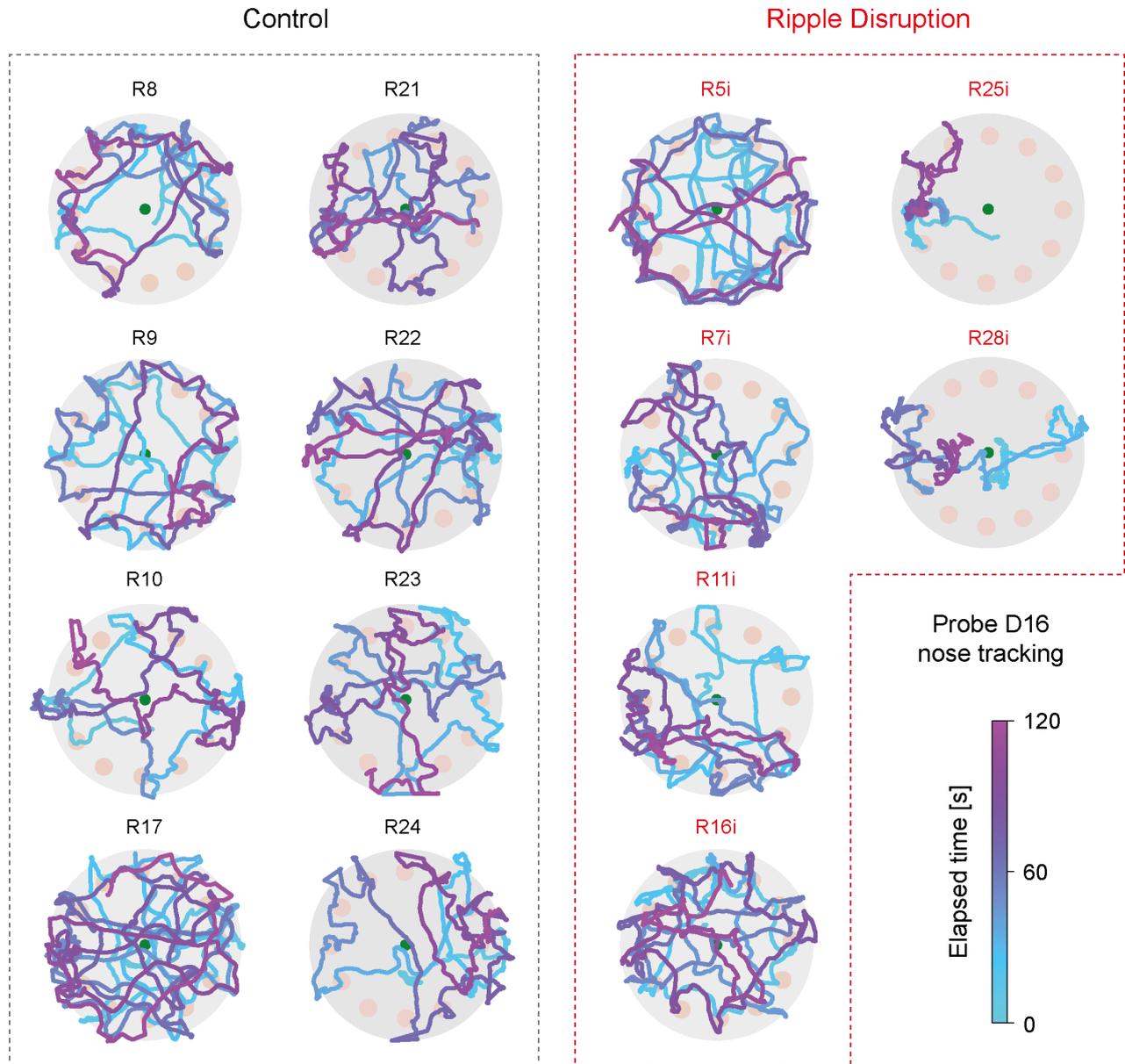


Fonte: elaborada pelo autor.

Pela trajetória dos animais na sessão do dia D16 (Figura 18) é possível notar que, de fato, grande parte dos animais do grupo perturbação de *ripples* se locomove pouco (e por pouco tempo) na área delimitada pelo quadrante-alvo. Alguns deles também apresentam trajetórias bastante concentradas na região do quadrante oposto. Além disso, as trajetórias e os respectivos tempos de locomoção parecem sugerir que há uma dinâmica na exploração do labirinto ao longo do tempo que não deve ser ignorada. Na tentativa de compreender melhor essa mesma dinâmica, alguns trabalhos reportam o tempo de permanência nos quadrantes de forma fracionada, analisando-o em intervalos mais curtos (RêGO, 2014; BERALDO, 2024).

Diante disso, os tempos de permanência nos quadrantes Q1 (alvo) e Q3 (oposto)

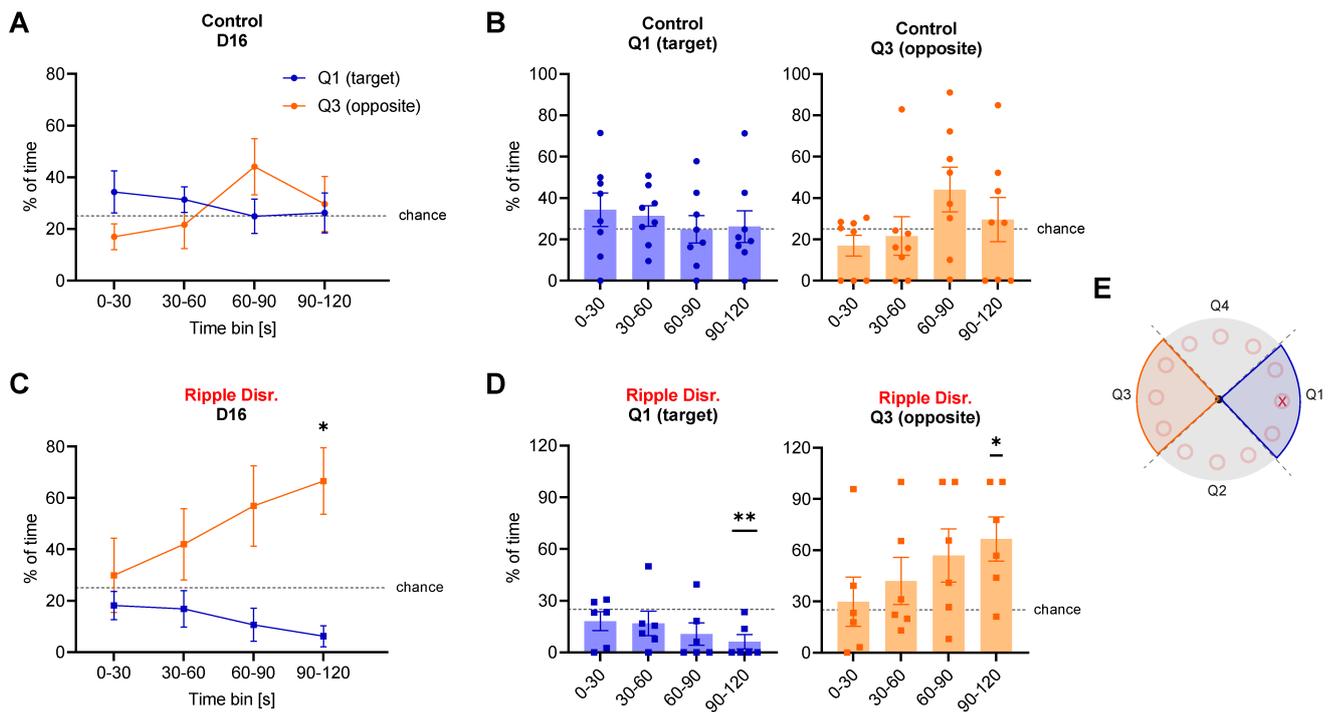
Figura 18 – Trajetória dos animais na sessão de teste do dia D16. As trajetórias foram construídas a partir das coordenadas *frame a frame* do focinho dos animais. A escala de cores indica o tempo decorrido desde o início da sessão até seu término (duração de 2 minutos). O quadrante-alvo está localizado à direita na plataforma.



Fonte: elaborada pelo autor.

durante a sessão do dia D16 foram analisados em intervalos de 30 segundos. Nota-se que o grupo controle explorou ambos os quadrantes por tempos semelhantes desde o início da sessão (Figura 19A). Além disso, o tempo de exploração de cada um deles não ficou acima do percentual de acaso em nenhum dos intervalos analisados, evidenciando a ausência de preferência por qualquer um dos dois quadrantes ao longo de toda a sessão (Figura 19B). No caso do grupo perturbação de *ripples*, os animais começam por explorar igualmente os dois quadrantes, mas gradualmente passam a exibir uma preferência pelo quadrante oposto em detrimento não apenas do quadrante-alvo, mas também em relação

Figura 19 – Tempo despendido nos quadrantes Q1 e Q3 em intervalos de 30 segundos na sessão de teste do dia D16. (A) Percentual de tempo despendido pelos grupos controle e (C) perturbação de *ripples*. (B) Valores individuais do percentual de tempo despendido nos quadrantes Q1 e Q3 pelos grupos controle e (D) perturbação de *ripples*. Em todos os gráficos, a linha tracejada indica o percentual de tempo de 25% e os pontos e/ou barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média. (E) Identificação do posicionamento dos quadrantes Q1 e Q3 no labirinto. O orifício indicado com um “x” no quadrante Q1 (alvo) indica a posição do escape durante a etapa de aquisição. Os testes estatísticos e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 5.



Fonte: elaborada pelo autor.

à referência de 25% (Figuras 19C e D). Os resultados dos testes estatísticos que embasam essas observações estão indicados na Tabela 5.

Apesar de ser uma métrica válida para avaliar a memória espacial dos animais na sessão de teste, o tempo de permanência em cada quadrante não reflete, integralmente, uma atividade orientada à exploração dos buracos em busca do escape. Comportamentos de grooming, por exemplo, também estão incluídos na contabilização desse tempo. Um outro indicador de memória espacial que busca minimizar esse problema é o número de vezes em que cada orifício foi visitado (*head dips*) (BINDER et al., 2019). Neste trabalho, os *head dips* foram contabilizados por quadrante.

As Figuras 20A e B mostram que, na sessão de teste do dia D5, não houve diferença entre os grupos controle e perturbação de *ripples* quanto ao total de *head dips* no quadrante-alvo, e ambos visitaram mais os orifícios desse mesmo quadrante em com-

paração com os demais. Esse resultado é compatível com a manutenção da memória de localização do escape no dia seguinte ao término da aquisição. Já no dia D16, de maneira semelhante ao que foi observado em relação ao tempo despendido nos quadrantes, os animais controle apresentaram uma quantidade maior de *head dips* no quadrante-alvo em comparação com os do grupo perturbação de *ripples* (Figura 20C). Nesse mesmo dia e considerando-se integralmente o período da sessão, nenhum grupo apresentou preferência por algum quadrante específico no que se refere à visita dos orifícios (Figura 20D).

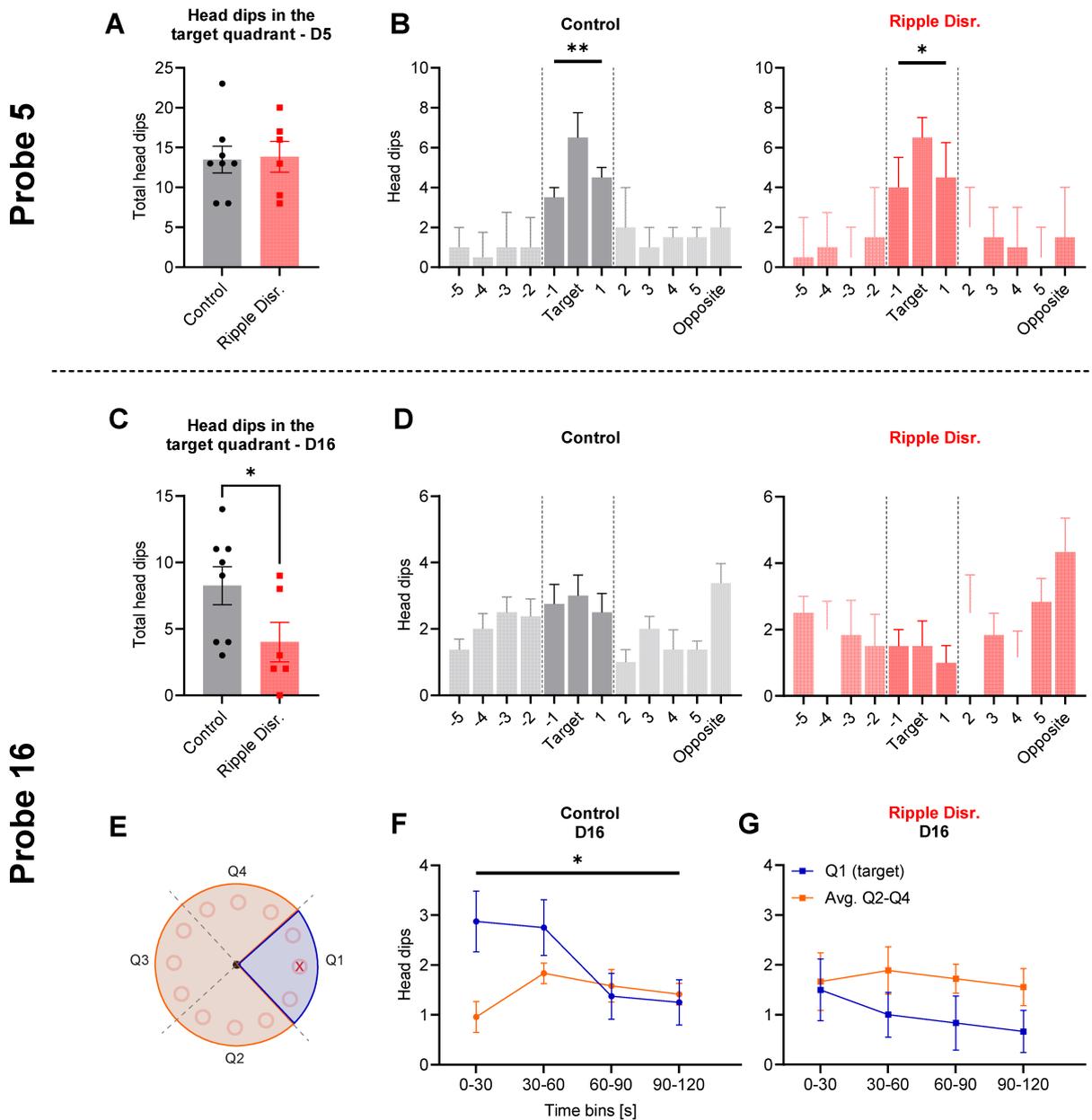
Assim como no caso do tempo despendido em cada quadrante, a análise da quantidade de *head dips* em intervalos de 30 segundos revela uma dinâmica ao longo da sessão que diferencia os dois grupos. Comparando o número de *head dips* no quadrante-alvo com a média dos outros quadrantes, os testes estatísticos mostram que há uma diferença significativa na interação quadrante-tempo (2way ANOVA) para o grupo controle, mas não foram capazes de identificar diferenças no grupo perturbação de *ripples* (Figuras 20F e G). A diferença observada no grupo controle, mesmo que não tenha sido discriminada no teste *post-hoc*, indica que a visita dos orifícios do quadrante-alvo por esse grupo é maior no início da sessão. Os resultados dos testes estatísticos que embasam essas observações estão indicados na Tabela 6.

Uma análise da velocidade média e da distância total percorrida nas sessões de teste se faz necessária pelos mesmos motivos que aqueles expostos na seção de aquisição. Não foram encontradas diferenças entre os grupos nem entre os dias de teste para essas duas variáveis (Figura 21). Os resultados dos testes estatísticos que embasam essas observações estão indicados na Tabela 7.

Por fim, na tentativa de relacionar o desempenho dos animais no teste do dia D16 com o desempenho no último dia de aquisição da tarefa (D4), foram calculadas as correlações entre indicadores da etapa de aquisição (latência primária, erros primário e secundário, uso da estratégia espacial e uso da estratégia aleatória) e indicadores da fase de teste (tempo despendido e número de *head dips* no quadrante-alvo). As correlações foram calculadas considerando-se tanto a duração completa da sessão de teste (2 minutos) quanto o primeiro intervalo de 30 segundos. Não foram encontradas correlações significativas entre nenhuma das variáveis testadas (Apêndices A e B; Figuras 38 e 39).

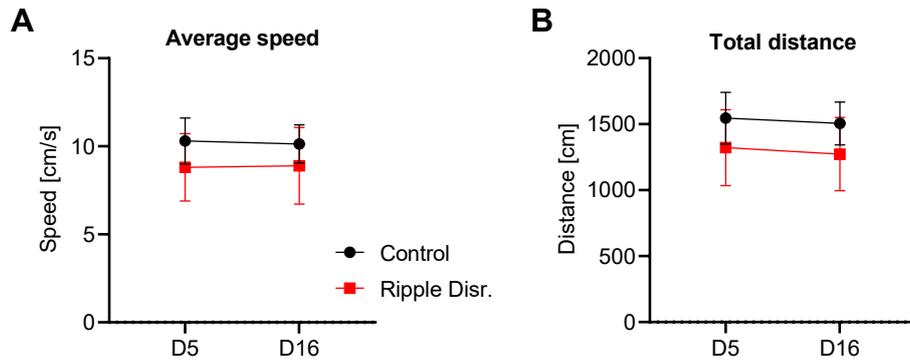
De maneira geral, os resultados do experimento no labirinto de Barnes indicam que a interrupção de *ripples* durante o sono pós-aprendizado gerou alterações no desempenho durante a etapa de treinamento e na sessão de teste do dia D16, quando a memória remota é avaliada. Entretanto, a manipulação realizada parece ter sido incapaz de prejudicar a evocação de mais curto prazo, testada um dia após o fim da aquisição. Na próxima seção são analisadas a estrutura do sono dos animais antes e ao longo dos dias de aquisição no labirinto.

Figura 20 – Número de *head dips* nas sessões de teste dos dias D5 e D16. (A) Total de visitas dos grupos controle e perturbação de *ripples* a orifícios do quadrante-alvo nos dias D5 e (C) D16. (B) Número de visitas em cada orifício nos dias D5 e (D) D16. As linhas tracejadas agrupam os orifícios pertencentes ao quadrante-alvo. (E) Identificação do posicionamento dos quadrantes no labirinto. O orifício indicado com um “x” no quadrante Q1 (alvo) indica a posição do escape durante a etapa de aquisição. (F) Número de *head dips* dos grupos controle e (G) perturbação de *ripples* no quadrante-alvo em comparação com a média dos outros quadrantes para cada intervalo de 30 segundos da sessão do dia D16. Em todos os gráficos, os pontos e/ou barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média. Os testes estatísticos e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 6.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 21 – Velocidade e distância percorrida dos na etapa de teste do labirinto de Barnes. (A) Velocidade média e (B) distância total percorrida até o fim das sessões dos dias D5 e D16 (média  $\pm$  erro padrão da média). Os testes estatísticos e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 7.



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 4 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 17. Signif. = Significativo; ns = não significativo; \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ ; # :  $p \leq 0,0001$

Figura	Teste	Fator/Comparação	Estatística	Valor $p$	Signif.?
A	Teste t	RippleDisr vs Controle	$t(12) = 1,230$	0,2424	ns
B	Teste t	Controle Q1 vs 25%	$t(7) = 3,889$	0,0060	**
	Teste t	Controle Q2 vs 25%	$t(7) = 2,529$	0,0393	*
	Teste t	Controle Q3 vs 25%	$t(7) = 1,562$	0,1622	ns
	Teste t	Controle Q4 vs 25%	$t(7) = 3,152$	0,0161	*
	Teste t	RippleDisr Q1 vs 25%	$t(5) = 4,936$	0,0043	**
	Teste t	RippleDisr Q2 vs 25%	$t(5) = 1,992$	0,1030	ns
	Teste t	RippleDisr Q3 vs 25%	$t(5) = 3,240$	0,0230	*
	Teste t	RippleDisr Q4 vs 25%	$t(5) = 3,583$	0,0158	*
	C	Teste t	RippleDisr vs Controle	$t(12) = 2,773$	0,0169
D	Teste t	Controle Q1 vs 25%	$t(7) = 0,9449$	0,3762	ns
	Teste t	Controle Q2 vs 25%	$t(7) = 1,367$	0,2138	ns
	Teste t	Controle Q3 vs 25%	$t(7) = 0,9791$	0,3602	ns
	Teste t	Controle Q4 vs 25%	$t(7) = 0,7365$	0,4854	ns
	Teste t	RippleDisr Q1 vs 25%	$t(5) = 3,753$	0,0133	*
	Teste t	RippleDisr Q2 vs 25%	$t(5) = 0,2049$	0,8457	ns
	Teste t	RippleDisr Q3 vs 25%	$t(5) = 2,234$	0,0758	ns
	Teste t	RippleDisr Q4 vs 25%	$t(5) = 2,025$	0,0987	ns

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 5 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 19. Signif. = Significativo; Interv. = Intervalo; Dif. = Diferença; ns = não significativo; \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ ; # :  $p \leq 0,0001$

Figura	Teste	Fator/Comparação	Estatística	Valor $p$	Signif.?
A	RM 2way ANOVA	Grupo	$F(1, 14) = 0,0406$	0,8431	ns
	RM 2way ANOVA	Interv. tempo	$F(2, 365, 33, 12) = 0,4604$	0,6671	ns
	RM 2way ANOVA	Grupo x Interv. tempo	$F(3, 42) = 1,843$	0,1541	ns
B	Teste t	Q1: 0-30 vs 25%	$t(7) = 1,149$	0,2882	ns
	Teste t	Q1: 30-60 vs 25%	$t(7) = 1,286$	0,2394	ns
	Teste t	Q1: 60-90 vs 25%	$t(7) = 0,0187$	0,9856	ns
	Teste t	Q1: 90-120 vs 25%	$t(7) = 0,1572$	0,8795	ns
	Teste t	Q3: 0-30 vs 25%	$t(7) = 1,599$	0,1537	ns
	Teste t	Q3: 30-60 vs 25%	$t(7) = 0,3576$	0,7312	ns
	Teste t	Q3: 60-90 vs 25%	$t(7) = 1,762$	0,1214	ns
	Teste t	Q3: 90-120 vs 25%	$t(7) = 0,4352$	0,6766	ns
	C	RM 2way ANOVA	Grupo	$F(1, 10) = 10,36$	0,0092
RM 2way ANOVA		Interv. tempo	$F(2, 454, 24, 54) = 0,7725$	0,4970	ns
RM 2way ANOVA		Grupo x Interv. tempo	$F(3, 30) = 3,090$	0,0419	*
Bonferroni		Q1-Q3: 0-30	Dif. média = -11,72	>0,9999	ns
Bonferroni		Q1-Q3: 30-60	Dif. média = -25,11	0,5911	ns
Bonferroni		Q1-Q3: 60-90	Dif. média = -46,20	0,1236	ns
Bonferroni		Q1-Q3: 90-120	Dif. média = -60,39	0,0175	*
D	Teste t	Q1: 0-30 vs 25%	$t(5) = 1,243$	0,2689	ns
	Teste t	Q1: 30-60 vs 25%	$t(5) = 1,152$	0,3014	ns
	Teste t	Q1: 60-90 vs 25%	$t(5) = 2,225$	0,0767	ns
	Teste t	Q1: 90-120 vs 25%	$t(5) = 4,565$	0,0060	**
	Teste t	Q3: 0-30 vs 25%	$t(5) = 0,3389$	0,7484	ns
	Teste t	Q3: 30-60 vs 25%	$t(5) = 1,225$	0,2751	ns
	Teste t	Q3: 60-90 vs 25%	$t(5) = 2,036$	0,0974	ns
	Teste t	Q3: 90-120 vs 25%	$t(5) = 3,210$	0,0237	*

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 6 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 20. Signif. = Significativo; Quadr. = Quadrante; ns = não significativo; \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ ; # :  $p \leq 0,0001$

Figura	Teste	Fator/Comparação	Estatística	Valor $p$	Signif.?
A	Teste t unicaudal	RippleDisr vs Controle	$t(12) = 0,1304$	0,4492	ns
B	RM 1way ANOVA	Controle: Quadrante	$F(1, 482, 10, 38) = 20,24$	0,0005	***
	Dunnett	Controle: Q1 vs Q2	$Dif.média = 8,375$	0,0035	**
	Dunnett	Controle: Q1 vs Q3	$Dif.média = 9,000$	0,0058	**
	Dunnett	Controle: Q1 vs Q4	$Dif.média = 9,375$	0,0044	**
	RM 1way ANOVA	RippleDisr: Quadrante	$F(2, 203, 11, 02) = 13,26$	0,0010	***
	Dunnett	RippleDisr: Q1 vs Q2	$Dif.média = 8,167$	0,0242	*
	Dunnett	RippleDisr: Q1 vs Q3	$Dif.média = 9,833$	0,0114	*
	Dunnett	RippleDisr: Q1 vs Q4	$Dif.média = 9,333$	0,0162	*
C	Teste t unicaudal	RippleDisr vs Controle	$t(12) = 2,023$	0,0329	*
D	RM 1way ANOVA	Controle: Quadrante	$F(2, 304, 16, 13) = 2,645$	0,0957	ns
	Dunnett	Controle: Q1 vs Q2	$Dif.média = 3,875$	0,0606	ns
	Dunnett	Controle: Q1 vs Q3	$Dif.média = 2,125$	0,4636	ns
	Dunnett	Controle: Q1 vs Q4	$Dif.média = 1,375$	0,7340	ns
	RM 1way ANOVA	RippleDisr: Quadrante	$F(2, 098, 10, 49) = 1,977$	0,1861	ns
	Dunnett	RippleDisr: Q1 vs Q2	$Dif.média = -1,500$	0,8701	ns
	Dunnett	RippleDisr: Q1 vs Q3	$Dif.média = -5,667$	0,0607	ns
	Dunnett	RippleDisr: Q1 vs Q4	$Dif.média = -1,333$	0,6644	ns
F	RM 2way ANOVA	Quadrante	$F(1, 14) = 2,446$	0,1402	ns
	RM 2way ANOVA	Interv. tempo	$F(2, 441, 34, 17) = 2,919$	0,0579	ns
	RM 2way ANOVA	Quadr. x Interv. tempo	$F(3, 42) = 3,950$	0,0144	*
	Bonferroni	Q1 vs Q2-Q4: 0-30	Dif. média = 1,917	0,0730	ns
	Bonferroni	Q1 vs Q2-Q4: 30-60	Dif. média = 0,9167	0,6369	ns
	Bonferroni	Q1 vs Q2-Q4: 60-90	Dif. média = -0,2083	>0,9999	ns
G	RM 2way ANOVA	Quadrante	$F(1, 10) = 2,046$	0,1831	ns
	RM 2way ANOVA	Interv. tempo	$F(2, 078, 20, 78) = 0,5855$	0,5720	ns
	RM 2way ANOVA	Quadr. x Interv. tempo	$F(3, 30) = 0,4560$	0,7150	ns

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 7 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 21. Signif. = Significativo; ns = não significativo; \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ ; # :  $p \leq 0,0001$

Figura	Teste	Fator/Comparação	Estatística	Valor $p$	Signif.?
A	RM 2way ANOVA	Grupo	$F(1, 12) = 0,4122$	0,5329	ns
	RM 2way ANOVA	Dia	$F(1, 12) = 0,002963$	0,9575	ns
	RM 2way ANOVA	Grupo x Dia	$F(1, 12) = 0,03418$	0,8564	ns
B	RM 2way ANOVA	Grupo	$F(1, 12) = 0,5646$	0,4669	ns
	RM 2way ANOVA	Dia	$F(1, 12) = 0,1962$	0,6657	ns
	RM 2way ANOVA	Grupo x Dia	$F(1, 12) = 0,002038$	0,9647	ns

Fonte: elaborada pelo autor.

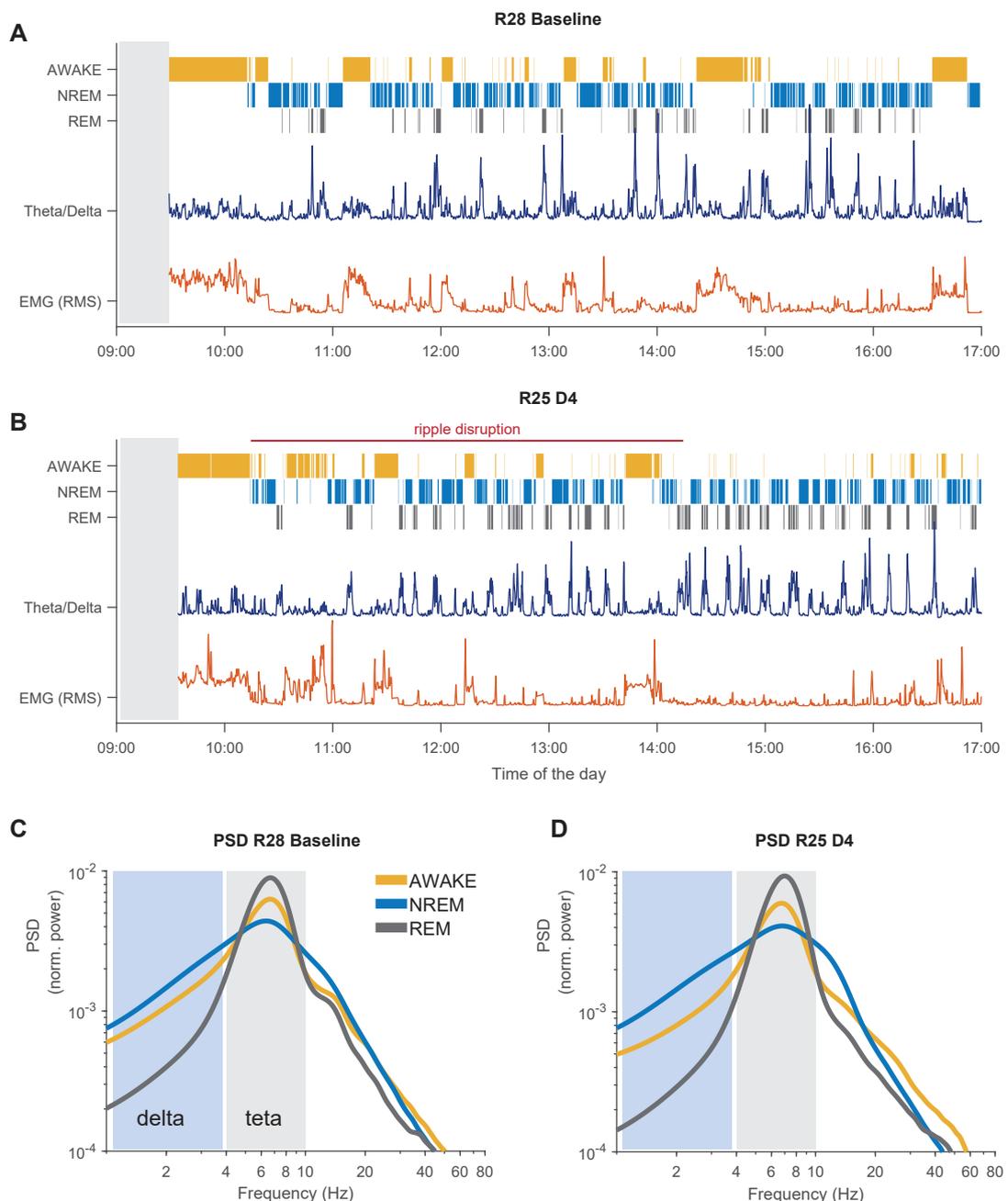
## 9.2 Estrutura do sono

O primeiro conjunto de análises realizado a partir dos registros eletrofisiológicos foi o de caracterização do ciclo sono/vigília antes e após o treinamento no labirinto de Barnes. Tais análises permitem verificar, em primeiro lugar, se houve ou não alterações associadas ao aprendizado comparáveis com aquelas reportadas na literatura. Em segundo lugar, possibilitam avaliar alguns possíveis impactos da manipulação elétrica na estrutura do sono. É importante garantir que os estímulos aplicados com o intuito de perturbar as *ripples* não tenham interferido no sono dos animais. Nesse caso, poderia-se questionar se as alterações comportamentais observadas seriam consequência da redução do tempo de sono ou de sua maior fragmentação, e não da perturbação seletiva do mecanismo de consolidação. São várias as evidências na literatura que associam má qualidade do sono a prejuízos na formação de memória espacial (STEPANSKI, 2002; CHEN et al., 2023).

Inicialmente, foi realizada a classificação dos estágios do ciclo sono/vigília a partir do registro eletromiográfico do músculo nucal e do registro de LFP da região de CA1 do hipocampo dorsal. Tal classificação foi feita por meio de uma *toolbox* desenvolvida e validada pelo nosso grupo de pesquisa (MENDES, 2021; BERALDO, 2024). O registro foi dividido em trechos consecutivos de 10 segundos de duração, denominados neste trabalho como “épocas”, e sobre eles é que se deu a classificação. A título de exemplo, a Figura 22 apresenta o hipnograma de dois animais em dias distintos. Nota-se que, em geral, o início dos registros é marcado por épocas de vigília, caracterizadas por valores mais altos no RMS do eletromiograma. Isso ocorre tanto no registro de linha de base (Figura 22A) quanto no registro pós-aquisição (Figura 22B). Progressivamente, os períodos de vigília dão espaço aos estados de sono, em que há uma atividade mais baixa do eletromiograma. É possível diferenciar as épocas de sono REM das de NREM pois as primeiras apresentam uma razão teta/delta mais elevada. Os gráficos de densidade de potência espectral (PSD, do inglês, *power spectral density*) mostram a predominância relativa de teta durante o sono REM e de oscilações lentas durante o sono NREM (Figuras 22C e D). Para o dia de aquisição no labirinto de Barnes, está destacado também o período em que houve perturbação de *ripples*. Ele corresponde às 4 primeiras horas de registro após o início do sono.

A partir da identificação dos estados dos animais foi possível analisar mais detalhadamente a estrutura do ciclo sono/vigília após a realização da tarefa, avaliando-se também os possíveis efeitos da estimulação elétrica aplicada. Vale destacar que, entre os diferentes animais, houve variações no momento de início do registro: enquanto um animal teve seu registro iniciado 5 minutos após a colocação na caixa, outro passou a ser registrado após 15 minutos, por exemplo. Variações no início do registro também ocorreram entre os diferentes dias. Por essa razão, optou-se por considerar nas análises desta seção apenas as 6 horas de registro logo após o início do sono de cada animal, marcado por pelo

Figura 22 – Exemplos representativos de hipnogramas e PSDs de dois animais. **(A)** Hipnograma do animal R28, registro de linha de base. **(B)** Hipnograma do animal R25, registro após aquisição no quarto dia (D4) do labirinto de Barnes. A barra horizontal vermelha compreende o período de perturbação de *ripples*, que abrangeu as 4 primeiras horas de registro após o início do sono. A classificação dos estados leva em consideração os valores RMS do registro de eletromiografia do músculo nugal e a razão teta/delta do LFP da região de CA1 do hipocampo dorsal. **(C)** PSD médio (20 épocas classificadas manualmente) do animal R28 (linha de base) e **(D)** do animal R25 (D4) para cada um dos estados. As faixas de frequência correspondentes às oscilações delta (0,5-4 Hz) e teta (4-10 Hz) estão indicadas pelas áreas em azul e cinza, respectivamente.



Fonte: elaborada pelo autor.

menos 2 épocas consecutivas (20 segundos) de sono NREM ou REM.

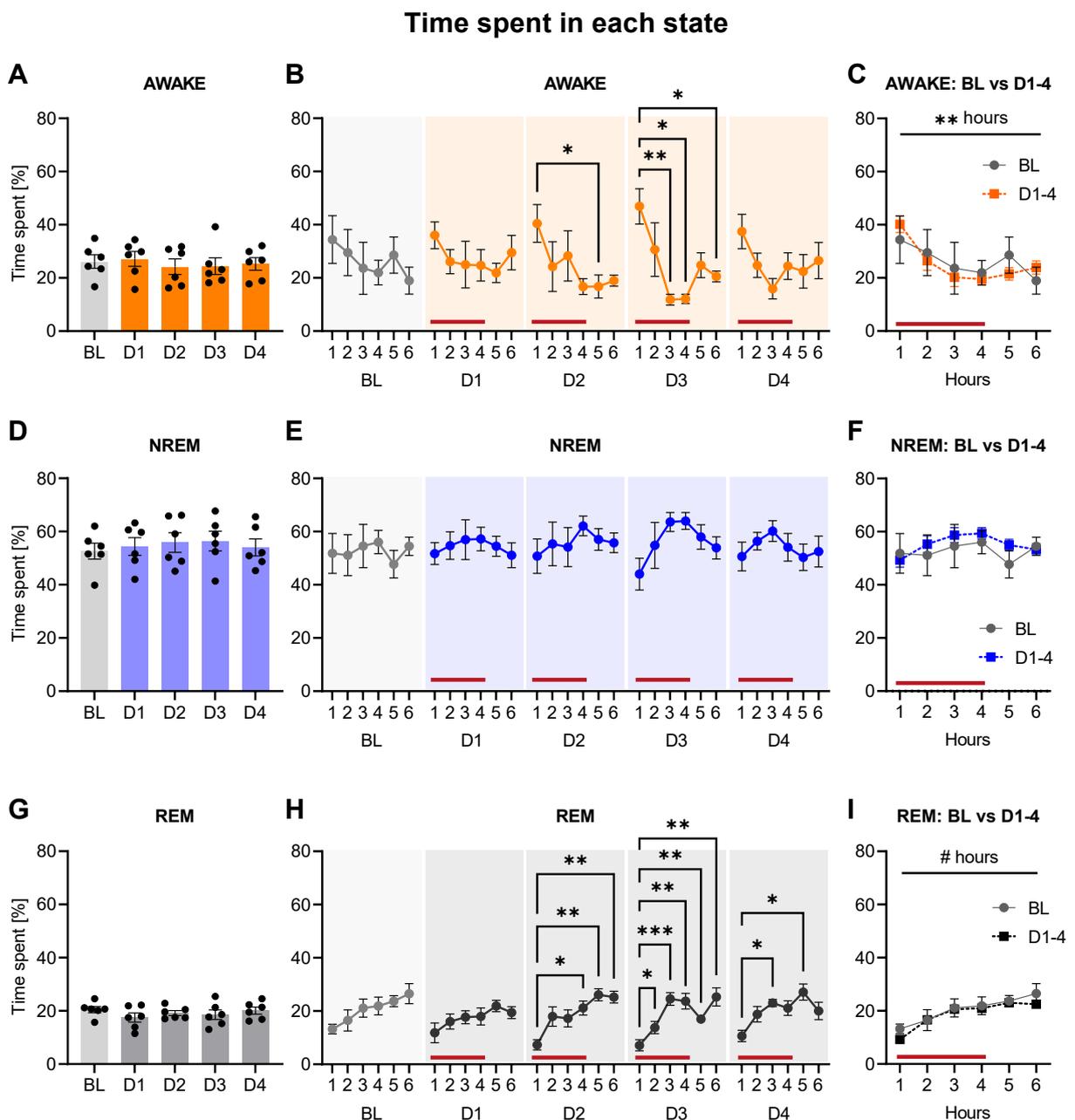
Em relação ao percentual de tempo despendido em cada estado (vigília, NREM e REM), não foram encontradas diferenças entre a linha de base e os dias de realização da tarefa (Figuras 23A, D e G). Esse resultado é similar ao encontrado em outro trabalho do nosso grupo, que também avaliou a estrutura do sono após aquisição no labirinto de Barnes, mas em animais que não passaram por nenhum tipo de intervenção (BERALDO, 2024). Os resultados dos testes estatísticos que embasam esse e outros achados apresentados na Figura 23 estão indicados na Tabela 8.

O problema de uma análise que considera todo o período de registro é que ela, por prover informações mais globais, acaba por omitir a dinâmica de permanência nos estados ao longo das 6 horas de sono pós-aquisição. Um olhar mais cuidadoso para essa dinâmica talvez possa revelar alterações importantes na estrutura do sono dos animais. Nesse sentido, ao dividir o registro de sono em intervalos consecutivos de 1 hora de duração, foi observado um aumento do tempo despendido em sono REM ao longo das horas nos dias D2, D3 e D4 (Figura 23H; comparações feitas em relação à primeira hora). Esse aumento é compatível com o que se espera da dinâmica natural do sono ao longo do tempo (SIMASKO; MUKHERJEE, 2009). Nos dias D2 e D3, o aumento de tempo em REM foi acompanhado por uma redução do tempo em vigília (Figura 23B), mas em relação ao sono NREM não foi possível identificar nenhuma diferença entre a primeira hora de registro e as demais (Figura 23E).

As comparações realizadas até agora consideraram o período inteiro de registro (Figuras 23A, D e G) ou, quando colocadas de hora em hora, avaliaram a linha de base e os dias de aquisição separadamente (Figuras 23B, E e H). Surge então a pergunta: existe alguma diferença entre a linha de base e os dias de aquisição quando os intervalos de 1 hora são comparados par-a-par? A resposta para essa pergunta poderia fornecer evidências de que, por exemplo, as primeiras horas pós-aquisição apresentariam mais tempo em sono NREM comparativamente com o registro de referência. Ou então, de que a estimulação elétrica, cuja aplicação foi habilitada pelas 4 primeiras horas do sono pós-aquisição, pudesse gerar um desbalanço no perfil de tempo gasto em cada estado. Para responder a essa pergunta, os dias de aquisição foram agrupados e comparados com o de referência. Foram observadas variações no fator “horas” para os estados de vigília e sono REM, reforçando a existência de uma dinâmica ao longo das horas, mas não no fator “dia”, o que indica ausência de diferença entre a linha de base e os dias de aquisição seguidos por perturbação de *ripples* (Figuras 23C, F e I). Esses resultados também indicam que, em relação ao registro de referência, os períodos de estimulação elétrica não geraram efeitos observáveis nos tempos despendidos em cada estado.

Outra métrica a ser analisada em conjunto com o percentual de tempo em cada estado é o número de *bouts*. O *bout* é definido como um bloco contínuo de épocas clas-

Figura 23 – Tempo despendido em cada estágio do ciclo sono/vigília ao longo dos dias de aprendizado no labirinto de Barnes. **(A)** Percentual do tempo total nos estados de vigília, **(D)** sono NREM e **(G)** sono REM para cada dia de registro, considerando-se um período total de 6 horas após o início do sono. Os pontos individuais correspondem aos diferentes animais. **(B)** Percentual de tempo (média de todos os animais) nos estados de vigília, **(E)** sono NREM e **(H)** sono REM ao longo das 6 horas de registro. **(C)** Comparação entre a linha de base e os dias de realização da tarefa (D1 ao D4) no que diz respeito ao percentual de tempo nos estados de vigília, **(F)** sono NREM e **(I)** sono REM. Em todos os gráficos, os pontos e/ou barras de dados indicam média  $\pm$  erro padrão da média. BL = linha de base, D1 = dia 1, D2 = dia 2, D3 = dia 3, D4 = dia 4. O período de estimulação está destacado pelas barras horizontais vermelhas. Os testes estatísticos e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 8.



Fonte: elaborada pelo autor.

sificadas em um mesmo estado. Um aumento no número de *bouts* pode indicar maior fragmentação do sono e vários trabalhos têm mostrado a relação entre a fragmentação de sono e prejuízos na formação de memória (ROLLS et al., 2011; JOINER, 2019; OKUDA et al., 2021).

No contexto deste trabalho e considerando todo o período de registro, não foi observada redução nem aumento na taxa de *bouts* em cada estado após aquisição no labirinto (Figuras 24A, D e G; testes estatísticos na Tabela 9). Além disso, com base na análise de hora em hora, verifica-se que há um aumento na taxa de *bouts* em REM ao longo das horas em todos os dias de registro pós-aquisição (Figura 24H). Esse aumento parece não estar relacionado a uma maior fragmentação do sono, mas sim ao incremento natural nos períodos de REM ao longo do dia (SIMASKO; MUKHERJEE, 2009).

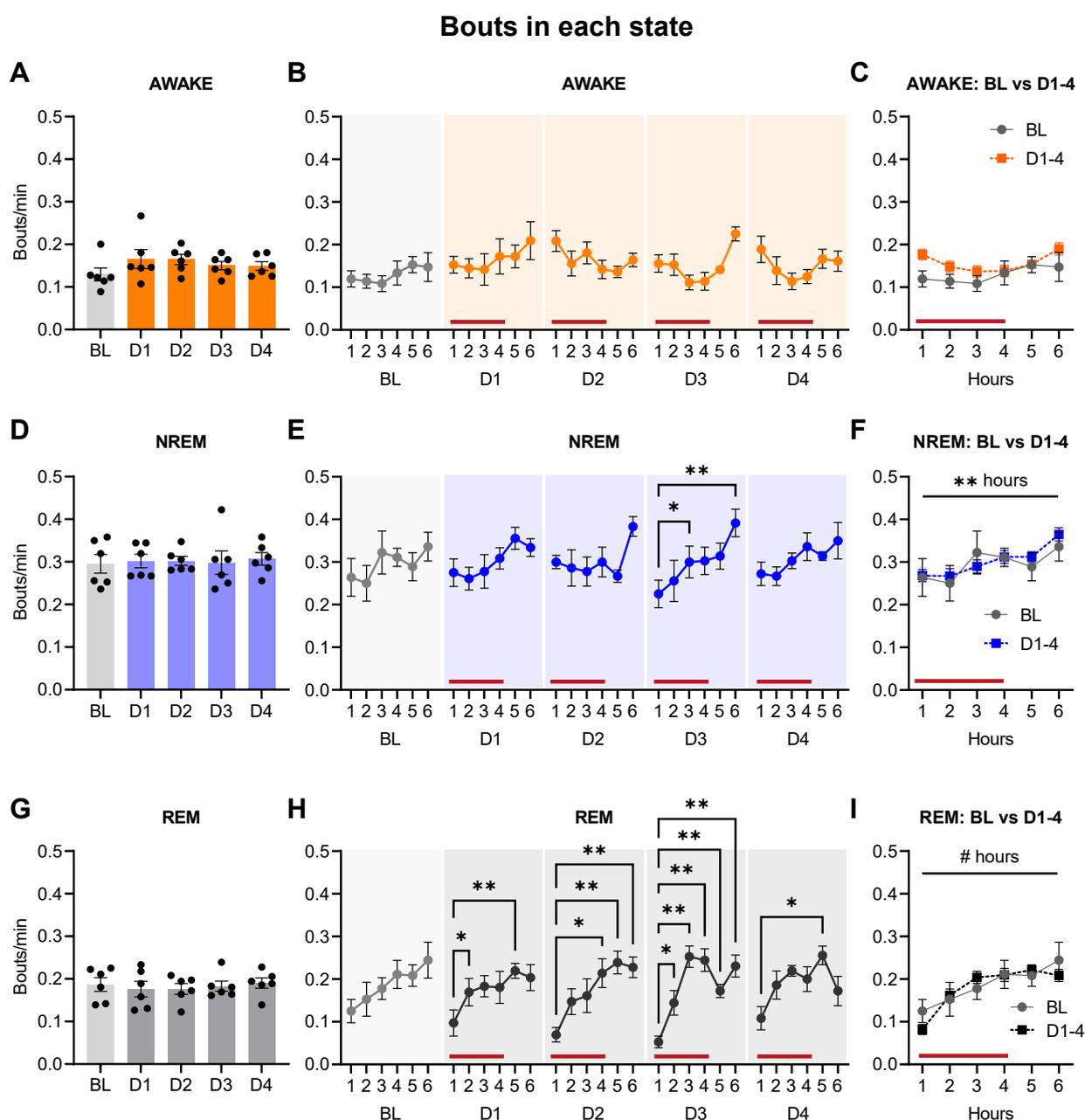
Ao comparar a linha de base com os dias de aquisição, a análise de hora em hora também indica que a taxa de *bouts* em sono NREM e REM aumenta ao longo do tempo de registro, mas não revela nenhuma diferença entre linha de base e pós-aquisição (Figuras 24F e I). Já para o estado de vigília, a taxa de *bouts* permanece inalterada no decorrer das horas (Figura 24C). A ausência de diferença entre a linha de base e a aquisição, principalmente nas 4 primeiras horas, evidencia que a aplicação dos estímulos elétricos não gerou fragmentação de sono.

Ainda com o intuito de verificar se os estímulos elétricos aplicados possam ter promovido a transição do estado de sono para o de vigília e, portanto, contribuído para os efeitos comportamentais observados mais pela perturbação do sono e menos pela interrupção seletiva das *ripples*, foram avaliados os estados em torno dos eventos de estimulação (Figura 25). Um trecho representativo mostra que a estimulação se concentra durante o sono e que, durante esse período, não há aumento da atividade do EMG comparativamente ao de vigília (Figura 25A).

A maior parte dos estímulos foi aplicada durante o sono NREM, como pode ser verificado na Figura 25B. Essa predominância não se deve, no entanto, ao fato de o animal ter passado proporcionalmente mais tempo em sono NREM: enquanto o sono NREM ocupa menos de 60% das 4 horas iniciais de registro (Figuras 23E e F), que é quando houve estimulação, um percentual mais alto de estímulos foi aplicado durante esse mesmo estado (81,3% na média dos dias). Trata-se de uma concentração dos estímulos nos períodos de sono NREM que não é proporcional ao tempo que esses períodos ocupam. Esse resultado é esperado, tendo em vista que as *ripples* ocorrem predominantemente nessa etapa do sono.

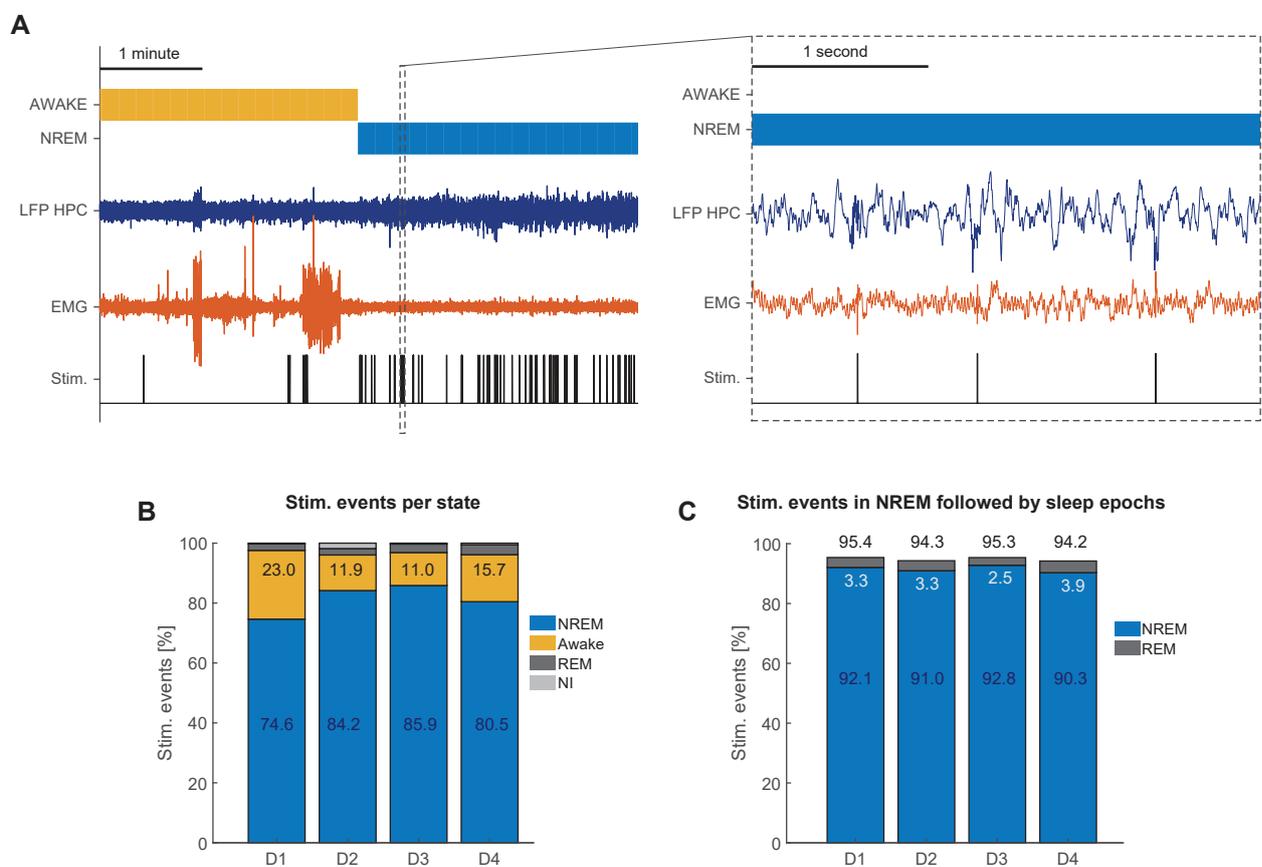
Pela Figura 25B é possível notar também que o primeiro dia de aquisição apresenta uma particularidade em relação aos demais: diferentemente dos dias D2, D3 e D4, em que os estímulos aplicados durante o estado de vigília correspondem a, no máximo, cerca de 16% do total, no dia D1 esse número sobe para 23%. Esse maior número de estímulos

Figura 24 – Taxa de *bouts* em cada estágio do ciclo sono/vigília ao longo dos dias de aprendizado no labirinto de Barnes. **(A)** Número de *bouts* por minuto em que o animal se encontrava em estado de vigília, **(D)** sono NREM e **(G)** sono REM para cada dia de registro, considerando-se um período total de 6 horas após o início do sono. Os pontos individuais correspondem aos diferentes animais. **(B)** Taxas de *bouts* (média de todos os animais) em cada uma das 6 horas de registro nos estados de vigília, **(E)** sono NREM e **(H)** sono REM. **(C)** Comparação entre a linha de base e os dias de realização da tarefa (D1 ao D4) no que diz respeito à taxa de *bouts* nos estados de vigília, **(F)** sono NREM e **(I)** sono REM. Em todos os gráficos, os pontos e/ou barras de dados indicam média  $\pm$  erro padrão da média. BL = linha de base, D1 = dia 1, D2 = dia 2, D3 = dia 3, D4 = dia 4. O período de estimulação está destacado pelas barras horizontais vermelhas. Os testes estatísticos e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 9.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 25 – Verificação dos estados em torno dos eventos de estimulação: a aplicação dos estímulos não promove transição de estados. **(A)** Exemplo de registros (animal R25, dia D2) do EMG do músculo nucal e do LFP do hipocampo, acompanhados pela classificação dos estados e pela indicação dos momentos em que houve estimulação elétrica. O zoom de um período mais curto, interno ao trecho considerado, está destacado à direita. **(B)** Percentual de estímulos aplicados em cada estado para cada dia de registro pós-aquisição (NI = estado não identificado). Os valores omitidos no gráfico são: REM: D1 = 2,2, D2 = 2,1, D3 = 2,8, D4 = 3,3; NI: D1 = 0,3, D2 = 1,8, D3 = 0,3, D4 = 0,6. **(C)** Percentual de estímulos aplicados durante o sono NREM seguidos por épocas de sono REM ou NREM em cada dia de registro pós-aquisição. Os valores acima das barras indicam o percentual total de estímulos aplicados em NREM seguidos por épocas de sono. D1 = dia 1, D2 = dia 2, D3 = dia 3, D4 = dia 4.



Fonte: elaborada pelo autor.

durante a vigília no primeiro dia se deve, provavelmente, ao período de ajuste do detector de movimento do *plugin*. Enquanto os parâmetros de detecção de movimento não são corretamente estabelecidos, muitos dos artefatos de movimento que possuem componentes significativos na banda de frequência das *ripples* acabam gerando uma resposta de disparo do estímulo pelo *plugin* (ver Figura 6 do artigo publicado, Parte I). Como esse ajuste ocorreu no início do registro do primeiro dia, é natural que tenham sido aplicados mais estímulos enquanto o animal se movimentava.

Por fim, é importante verificar o estado das épocas que imediatamente sucederam

a aplicação do estímulo. Se os estímulos de fato tivessem contribuído para despertar os animais, a maior parte das épocas subsequentes deveria ter sido classificada como vigília. Para essa análise optou-se por desconsiderar os estímulos aplicados já durante a vigília. Portanto, se forem considerados apenas os estímulos aplicados durante o sono NREM, 94,8% deles, na média de todos os dias, foram acompanhados por épocas também classificadas como sono (Figura 25C). Na composição desse percentual, mais de 90% das épocas que sucederam tais estímulos mantiveram o estado de NREM. Pode-se assumir que as outras, classificadas como NREM ou vigília, se devem a transições que já ocorreriam normalmente. Esses resultados reforçam que os estímulos aplicados em NREM com o intuito de interromper as *ripples* não provocaram a transição nem para o estado de vigília, conforme observado durante a realização dos registros, nem para o de sono REM.

De maneira geral, os resultados da análise da estrutura do sono evidenciam que não houve diferenças significativas entre o registro de referência e os registros pós-aquisição no que diz respeito ao tempo despendido e ao número de *bouts* em cada estado. A aplicação dos estímulos elétricos com o intuito de interromper as *ripples* também não gerou alterações nesses parâmetros nem promoveram o despertar dos animais, o que poderia ser um fator de confusão na validação dos resultados comportamentais. A próxima seção traz uma análise da ocorrência de *ripples* durante o sono pós-aquisição.

Tabela 8 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 23. Signif. = Significativo; Dif. = Diferença; ns = não significativo; \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ ; # :  $p \leq 0,0001$

Figura	Teste	Fator/Comparação	Estatística	Valor $p$	Signif.?
A	RM 1way ANOVA	Dia	$F(2, 493, 12, 46) = 0, 5519$	0,6260	ns
B (BL)	RM 1way ANOVA	Hora	$F(2, 763, 13, 81) = 0, 5251$	0,6584	ns
B (D1-4)	RM 2way ANOVA	Dia	$F(2, 222, 11, 11) = 0, 596$	0,5842	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(2, 392, 11, 96) = 4, 442$	0,0312	*
	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(2, 823, 14, 11) = 1, 228$	0,3345	ns
	Dunnett	D2: h1-h5	Dif. média = 23,70	0,0169	*
	Dunnett	D3: h1-h3	Dif. média = 35,09	0,0027	**
	Dunnett	D3: h1-h4	Dif. média = 34,81	0,0191	*
	Dunnett	D3: h1-h6	Dif. média = 26,34	0,0352	*
C	RM 2way ANOVA	Dia: BL vs D1-4	$F(1, 28) = 0, 08888$	0,7678	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(4, 303, 120, 5) = 3, 386$	0,0098	**
	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(5, 140) = 0, 5587$	0,7315	ns
	Dunnett	D1-4: h1-outros	Dif. média $\geq 13,76$	$\leq 0,0208$	*
D	RM 1way ANOVA	Dia	$F(2, 394, 11, 97) = 0, 5773$	0,6053	ns
E (BL)	RM 1way ANOVA	Hora	$F(2, 596, 12, 98) = 0, 2492$	0,8346	ns
E (D1-4)	RM 2way ANOVA	Dia	$F(1, 866, 9, 330) = 0, 3505$	0,6993	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(2, 441, 12, 21) = 1, 737$	0,2149	ns
	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(3, 268, 16, 34) = 0, 7746$	0,5345	ns
F	RM 2way ANOVA	Dia: BL vs D1-4	$F(1, 28) = 0, 4888$	0,4982	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(4, 165, 116, 6) = 1, 203$	0,3133	ns
	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(5, 140) = 0, 5005$	0,7754	ns
G	RM 1way ANOVA	Dia	$F(1, 895, 9, 474) = 1, 107$	0,3662	ns
H (BL)	RM 1way ANOVA	Hora	$F(2, 605, 13, 03) = 2, 260$	0,1349	ns
H (D1-4)	RM 2way ANOVA	Dia	$F(1, 817, 9, 087) = 0, 7614$	0,4827	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(2, 325, 11, 62) = 16, 81$	0,0003	***
	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(3, 270, 16, 35) = 1, 895$	0,1672	ns
	Dunnett	D2: h1-h4	Dif. média = -13,89	0,0187	*
	Dunnett	D2: h1-h5	Dif. média = -18,84	0,0059	**
	Dunnett	D2: h1-h6	Dif. média = -17,96	0,0038	**
	Dunnett	D3: h1-h2	Dif. média = -6,667	0,0175	*
	Dunnett	D3: h1-h3	Dif. média = -17,41	0,0009	***
	Dunnett	D3: h1-h4	Dif. média = -16,57	0,0087	**
	Dunnett	D3: h1-h5	Dif. média = -9,815	0,0054	**
	Dunnett	D3: h1-h6	Dif. média = -18,15	0,0049	**
	Dunnett	D4: h1-h3	Dif. média = -12,36	0,0326	*
	Dunnett	D4: h1-h5	Dif. média = -16,48	0,0403	*
I	RM 2way ANOVA	Dia: BL vs D1-4	$F(1, 28) = 1, 134$	0,2959	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(4, 109, 115, 0) = 10, 83$	<0,0001	#
	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(5, 140) = 0, 3859$	0,8578	ns
	Dunnett	D1-4: h1-outros	Dif. média $\leq -7,442$	$\leq 0,0008$	***

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 9 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 24. Signif. = Significativo; Dif. = Diferença; ns = não significativo; \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ ; # :  $p \leq 0,0001$

Figura	Teste	Fator/Comparação	Estatística	Valor $p$	Signif.?
A	RM 1way ANOVA	Dia	$F(1, 302, 6, 510) = 1, 859$	0,2243	ns
B (BL)	RM 1way ANOVA	Hora	$F(3, 170, 15, 85) = 0, 8879$	0,4735	ns
B (D1-4)	RM 2way ANOVA	Dia	$F(1, 201, 6, 003) = 0, 6255$	0,4881	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(2, 056, 10, 28) = 3, 364$	0,0743	ns
C	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(3, 331, 16, 65) = 1, 323$	0,3014	ns
	RM 2way ANOVA	Dia: BL vs D1-4	$F(1, 28) = 3, 134$	0,0876	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(4, 572, 128, 0) = 1, 764$	0,1310	ns
D	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(5, 140) = 0, 7339$	0,5992	ns
	RM 1way ANOVA	Dia	$F(2, 930, 14, 65) = 0, 1374$	0,9331	ns
E (BL)	RM 1way ANOVA	Hora	$F(2, 734, 13, 67) = 0, 9478$	0,4375	ns
E (D1-4)	RM 2way ANOVA	Dia	$F(2, 169, 10, 84) = 0, 08875$	0,9277	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(2, 737, 13, 68) = 4, 101$	0,0308	*
	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(3, 739, 18, 70) = 1, 332$	0,2947	ns
	Dunnett	D3: h1-h3	Dif. média = -0,07500	0,0405	*
F	Dunnett	D3: h1-h6	Dif. média = -0,1667	0,0065	**
	RM 2way ANOVA	Dia: BL vs D1-4	$F(1, 28) = 0, 1201$	0,7315	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(4, 635, 129, 8) = 4, 377$	0,0014	**
	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(5, 140) = 0, 4857$	0,7865	ns
G	Dunnett	D1-4: h1-h6	Dif. média = -0,09671	0,0002	***
	RM 1way ANOVA	Dia	$F(2, 125, 10, 62) = 0, 4322$	0,6714	ns
H (BL)	RM 1way ANOVA	Hora	$F(2, 639, 13, 19) = 1, 908$	0,1810	ns
H (D1-4)	RM 2way ANOVA	Dia	$F(2, 027, 10, 14) = 0, 4346$	0,6616	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(2, 269, 11, 34) = 16, 47$	0,0003	***
	Dunnett	D1: h1-h2	Dif. média = -0,07222	0,0101	*
	Dunnett	D1: h1-h5	Dif. média = -0,1222	0,0048	**
	Dunnett	D2: h1-h4	Dif. média = -0,1444	0,0208	*
	Dunnett	D2: h1-h5	Dif. média = -0,1694	0,0071	**
	Dunnett	D2: h1-h6	Dif. média = -0,1583	0,0044	**
	Dunnett	D3: h1-h2	Dif. média = -0,09167	0,0222	*
	Dunnett	D3: h1-h3	Dif. média = -0,2000	0,0016	**
	Dunnett	D3: h1-h4	Dif. média = -0,1917	0,0076	**
	Dunnett	D3: h1-h5	Dif. média = -0,1194	0,0015	**
	Dunnett	D3: h1-h6	Dif. média = -0,1778	0,0064	**
	Dunnett	D4: h1-h5	Dif. média = -0,1472	0,0449	*
	I	RM 2way ANOVA	Dia: BL vs D1-4	$F(1, 28) = 0, 1192$	0,7325
RM 2way ANOVA		Hora	$F(4, 146, 116, 1) = 8, 918$	<0,0001	#
RM 2way ANOVA		Hora x Dia	$F(5, 140) = 0, 8188$	0,5382	ns
Dunnett		D1-4: h1-outros	Dif. média $\leq -0,07986$	$\leq 0,0002$	***

Fonte: elaborada pelo autor.

### 9.3 Análise das SWRs

Neste trabalho, a detecção de *ripples* em tempo real foi feita por meio do *plugin* desenvolvido na Parte I, responsável por então disparar um comando de estimulação elétrica na VHC com o intuito de interrompê-las (GIRARDEAU et al., 2009; EGO-STENGEL; WILSON, 2010). A Figura 26 apresenta uma captura de tela do sistema de registro e estimulação em funcionamento.

Figura 26 – Capturas de tela do sistema de registro e estimulação em funcionamento. (A) Exemplo de um evento de *ripple* (retângulo branco; animal R25, linha de base). (B) Exemplo de perturbação de um evento de *ripple* (retângulo branco; animal R16, dia D1).



Fonte: elaborada pelo autor.

Diversos trabalhos têm mostrado que a ocorrência das *ripples* aumenta durante o sono subsequente ao aprendizado espacial (ESCHENKO et al., 2008; GIRARDEAU; CEI; ZUGARO, 2014; BINDER et al., 2019; MARSHALL et al., 2020). No caso específico da tarefa no labirinto de Barnes, os estudos de Binder et al. (2019) e de Beraldo (2024) confirmam essas mesmas observações. Adicionalmente, o aumento da ocorrência de *ripples* também é observado em resposta à aplicação de estímulos elétricos para interrompê-las durante o sono pós-aquisição (GIRARDEAU et al., 2009).

Com o intuito de verificar se também haveria um aumento na ocorrência de *ripples* subsequente ao aprendizado no labirinto, todas as *ripples* detectadas durante o sono NREM nas 6 horas após o início do sono foram contabilizadas. Nas 4 primeiras horas,

que coincidem com o período de estimulação, foram consideradas as detecções feitas pelo próprio *plugin* durante o registro. Já nas 2 horas finais e em todo o registro de linha de base, o *plugin* havia sido desabilitado para impedir a geração de comandos de estimulação. Nesses casos, portanto, as *ripples* foram detectadas offline por meio de uma simulação do *plugin* implementada em Matlab, a mesma utilizada na seção 3.1 do artigo da Parte I.

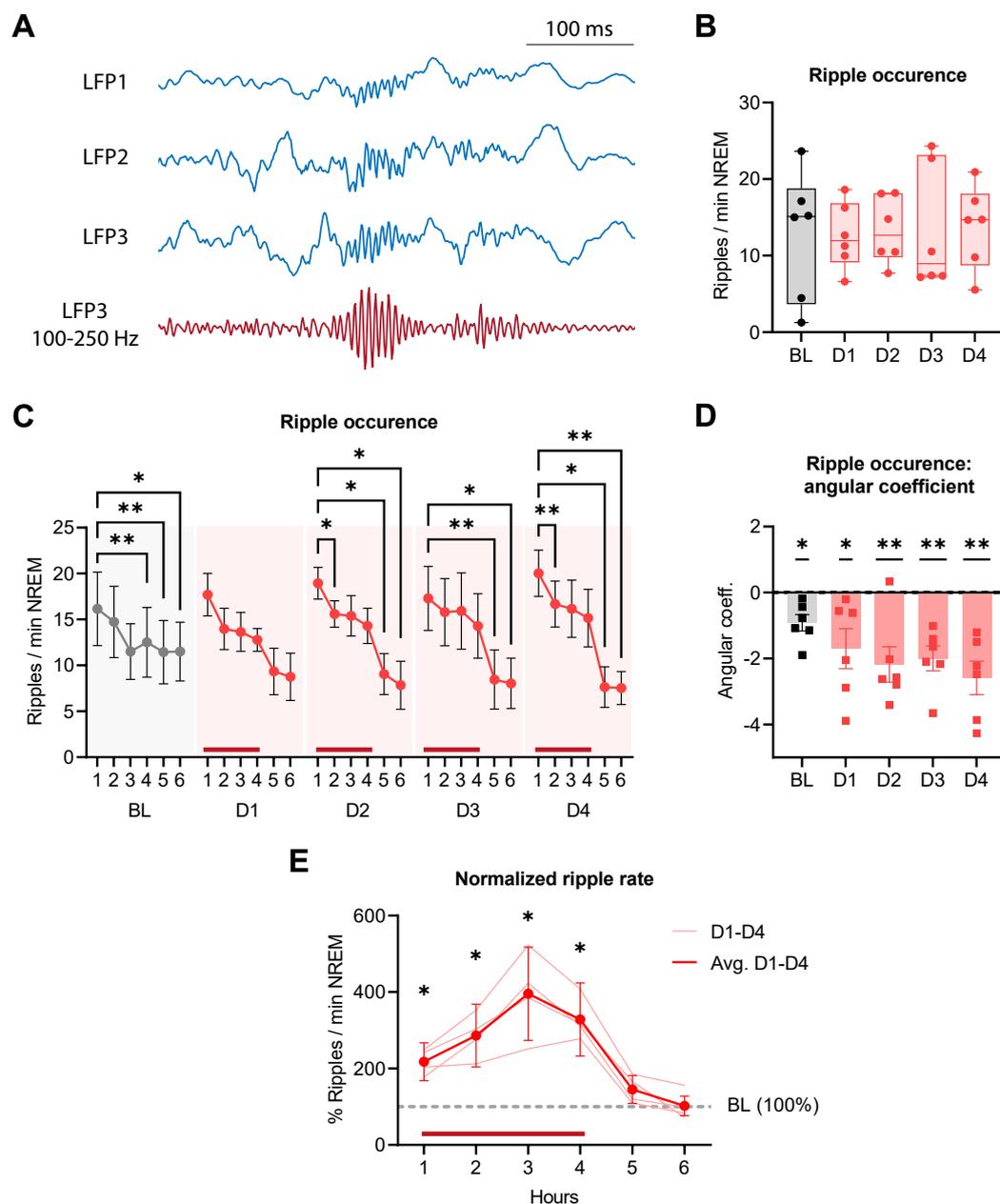
A Figura 27A mostra um exemplo de *ripple* detectada em um registro de linha de base. Em relação à ocorrência total de *ripples*, não foram encontradas diferenças significativas entre a linha de base e os registros pós-aquisição (Figura 27B). Esses resultados, entretanto, negligenciam a existência de uma dinâmica nessa variável ao longo das horas, que pode ser vista na Figura 27C. Para todos os dias, com exceção do dia D1, nota-se que há uma redução na ocorrência de *ripples* ao longo do tempo em relação à primeira hora de sono. Os coeficientes lineares das retas ajustadas aos dados de cada animal não só confirmam essa tendência, como também indicam a redução na ocorrência de *ripples* para o dia D1 (Figura 27D). Curiosamente, essa tendência de queda ao longo das horas condiz com a hipótese de que as SWRs estejam vinculadas ao processo de homeostase sináptica durante o sono (NORIMOTO et al., 2018; FINDLAY; TONONI; CIRELLI, 2020). Os resultados dos testes estatísticos que embasam tais observações estão indicados na Tabela 10.

O gráfico da Figura 27B e as barras de erro no gráfico da Figura 27C revelam uma grande variabilidade na taxa de ocorrência de *ripples* entre os animais, em especial no registro de referência. Essa alta variabilidade pode prejudicar uma comparação entre a linha de base e os dias de aquisição quando a taxa de *ripples* é avaliada de hora em hora. Uma alternativa para superar esse problema é considerar, nos dias de aquisição, os dados de cada animal como um percentual da hora correspondente no registro de linha de base. Por exemplo, a taxa de *ripples* do animal R28 na hora 2 do dia D3 (10,76 *ripples* por minuto de NREM) passa a ser de 209,85%, que corresponde ao percentual relativo ao valor da taxa desse mesmo animal na hora 2 do registro de linha de base (5,13 *ripples* por minuto de NREM, tomada como 100%).

Sendo assim, uma comparação dos dados normalizados revela que, nas 4 primeiras horas de sono pós-aquisição, que coincidem com o período de estimulação, a ocorrência de *ripples* é maior do que na linha de base (Figura 27E). Não foram encontradas diferenças nas 2 horas finais de registro. Esse efeito é resultado da própria perturbação de *ripples*, que acaba por induzir a geração de mais eventos desse tipo, como demonstrado em outros trabalhos (GIRARDEAU et al., 2009; GIRARDEAU; CEI; ZUGARO, 2014; BINDER et al., 2019). Em linha com esses achados, Girardeau, Cei e Zugaro (2014) mostram que o aumento na taxa de *ripples* ocorre apenas durante o período de interrupção, mas não antes nem depois.

A intensidade da corrente elétrica aplicada para interromper as *ripples* foi ajustada

Figura 27 – Ocorrência de *ripples* antes e durante a fase de aquisição no labirinto de Barnes. **(A)** Exemplo de *ripple* detectada (animal R25, registro de linha de base). Os canais estão ordenados do mais superficial (LFP1) até o mais profundo (LFP3). O registro em vermelho corresponde ao LFP3 filtrado na faixa de *ripples* (100-250 Hz). **(B)** Ocorrência de *ripples* por minuto de sono NREM durante as 6 horas após o início do sono nos registros de linha de base e pós-aquisição. Os *box plots* indicam os valores mínimo e máximo, a mediana, o primeiro quartil e o terceiro quartil. **(C)** Taxa de *ripples* em intervalos de 1 hora, totalizando 6 horas. **(D)** Coeficiente angular da reta ajustada aos dados de ocorrência de *ripples* em intervalos de 1 hora para cada animal. **(E)** Taxa de *ripples* em intervalos de 1 hora normalizada pela linha de base. Em todos os gráficos, com exceção de **(B)**, os pontos e/ou barras de dados indicam média  $\pm$  erro padrão da média. BL = linha de base, D1 = dia 1, D2 = dia 2, D3 = dia 3, D4 = dia 4. O período de estimulação está destacado pelas barras horizontais vermelhas. Os testes estatísticos e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 10.



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 10 – Testes estatísticos dos dados exibidos na Figura 27. Signif. = Significativo; Dif. = Diferença; ns = não significativo; \* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ ; # :  $p \leq 0,0001$

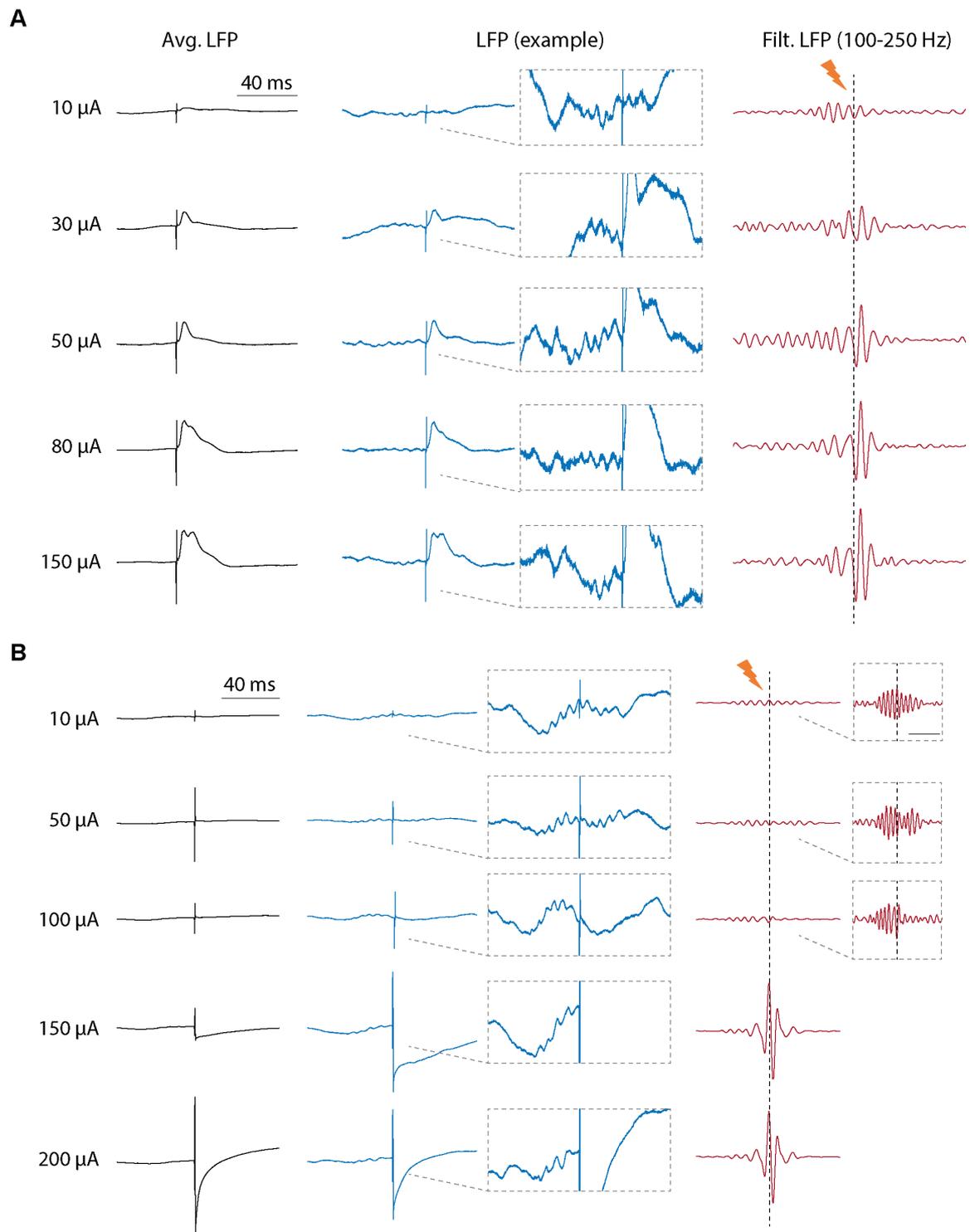
Figura	Teste	Fator/Comparação	Estatística	Valor $p$	Signif.?
B	Friedman	Dia	$Q = 0,2667$	0,9919	ns
C (BL)	RM 1way ANOVA	Hora	$F(2,024,10,12) = 4,232$	0,0458	*
	Dunnett	h1-h4	Dif. média = 3,641	0,0075	**
	Dunnett	h1-h5	Dif. média = 4,710	0,0065	**
	Dunnett	h1-h6	Dif. média = 4,651	0,0406	*
C (D1-4)	RM 2way ANOVA	Dia	$F(2,127,10,64) = 0,1690$	0,8585	ns
	RM 2way ANOVA	Hora	$F(1,668,8,338) = 21,46$	0,0007	***
	RM 2way ANOVA	Hora x Dia	$F(3,082,15,41) = 0,8091$	0,5107	ns
	Dunnett	D1	Dif. média $\leq 8,951$	$\geq 0,0750$	ns
	Dunnett	D2: h1-h2	Dif. média = 3,353	0,0303	*
	Dunnett	D2: h1-h5	Dif. média = 9,902	0,0269	*
	Dunnett	D2: h1-h6	Dif. média = 11,11	0,0356	*
	Dunnett	D3: h1-h5	Dif. média = 8,841	0,0065	**
	Dunnett	D3: h1-h6	Dif. média = 9,256	0,0104	*
	Dunnett	D4: h1-h2	Dif. média = 3,352	0,0031	**
	Dunnett	D4: h1-h5	Dif. média = 12,39	0,0116	*
	Dunnett	D5: h1-h6	Dif. média = 12,50	0,0099	**
D	Teste t	BL vs 0	$t(5) = 3,726$	0,0136	*
	Teste t	D1 vs 0	$t(5) = 2,803$	0,0378	*
	Teste t	D2 vs 0	$t(5) = 4,077$	0,0096	**
	Teste t	D3 vs 0	$t(5) = 5,316$	0,0032	**
	Teste t	D4 vs 0	$t(5) = 5,107$	0,0037	**
E	Teste t	h1 vs 100%	$t(23) = 2,379$	0,0260	*
	Teste t	h2 vs 100%	$t(23) = 2,275$	0,0325	*
	Teste t	h3 vs 100%	$t(23) = 2,419$	0,0239	*
	Teste t	h4 vs 100%	$t(23) = 2,388$	0,0255	*
	Teste t	h5 vs 100%	$t(23) = 1,234$	0,2296	ns
	Teste t	h6 vs 100%	$t(23) = 0,096$	0,9244	ns

Fonte: elaborada pelo autor.

individualmente para cada animal. O valor escolhido foi o mínimo suficiente para: 1) elicitare uma deflexão pós-estímulo semelhante à observada no trabalho de Girardeau et al. (2009), que corresponde a um período de silenciamento neuronal, e/ou 2) interromper o padrão característico da *ripple* no LFP. Correntes muito acima desse valor mínimo podem gerar, além de saturação do sinal de LFP, lesões no tecido. A Figura 28 apresenta dois exemplos da aplicação de estímulos de diferentes intensidades na tentativa de interromper as *ripples*. No primeiro caso (Figura 28A), é possível notar o surgimento da deflexão pós-estímulo no LFP e a abolição do evento a partir de 30  $\mu$ A. Já no segundo caso (Figura 28B), ainda que a deflexão não estivesse presente, verifica-se a interrupção do padrão oscilatório da *ripple* começando a partir de 100  $\mu$ A.

É importante verificar de modo mais sistemático se a estimulação elétrica foi, de fato, capaz de interromper os eventos de *ripples*. Uma das formas de se prosseguir com essa verificação é identificar e contabilizar, quando possível, os potenciais de ação de diferentes neurônios presentes na camada piramidal de CA1 logo após a estimulação. Conforme

Figura 28 – Abolição de *ripples*: efeitos no LFP em resposta à aplicação de estímulos elétricos de diferentes intensidades. **(A)** Exemplos de *ripples* estimuladas a 10, 30, 50, 80 e 150 A (animal R28). Coluna da esquerda: média dos LFPs centrados no momento da estimulação; coluna do meio: exemplo de *ripple* estimulada e zoom do respectivo evento; coluna da direita: LFP da coluna do meio filtrado na faixa de *ripples* (100-250 Hz), em que a linha tracejada indica o momento da estimulação. **(B)** Exemplos de *ripples* estimuladas a 10, 50, 100, 150 e 200 A (animal R11).



Fonte: elaborada pelo autor.

mostram alguns trabalhos, a interrupção bem-sucedida das *ripples* é acompanhada por uma redução dos spikes (EGO-STENGEL; WILSON, 2010), sejam de interneurônios ou de neurônios piramidais (GIRARDEAU et al., 2009).

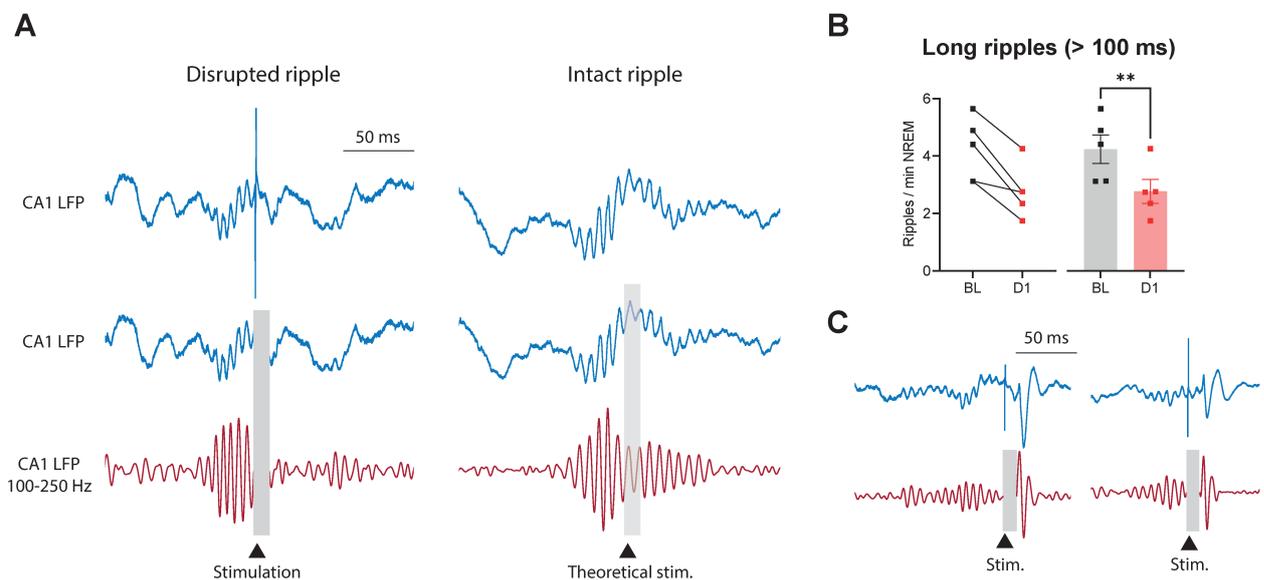
Outra forma de se atestar a interrupção das *ripples* é avaliar a duração média dos eventos. Em tese, um protocolo de interrupção adequado deve produzir, como efeito, *ripples* mais “curtas”. A dificuldade dessa abordagem se dá, no entanto, pelo fato de que o próprio estímulo gera oscilações estereotipadas no sinal filtrado do LFP, contaminando a medida de potência da *ripple* durante um período de até 60 ms após a estimulação (EGO-STENGEL; WILSON, 2010). Torna-se difícil definir a extensão das *ripples* pois, em muitos casos, elas são confundidas com o próprio artefato de estimulação.

Para transpor essa janela de interferência e verificar se o estímulo foi capaz de reduzir a duração das *ripples* neste trabalho, as *ripples* com duração acima de 100 ms foram contabilizadas durante o período de estimulação. Entende-se que a redução na ocorrência de *ripples* “longas” seja uma evidência da eficácia da estimulação. A Figura 29A apresenta um exemplo de *ripple* longa em comparação com uma *ripple* estimulada, cuja duração final se mostra mais reduzida (animal R25). Uma análise revela que, já no primeiro dia de estimulação, a taxa de *ripples* longas é menor que a do período equivalente no registro de linha de base (Figura 29B; teste t pareado,  $t(4) = 4,679$ ,  $p = 0,0095$ ). O animal R16 foi excluído dessa análise, já que no dia D1 houve momentos de queda da energia elétrica que interromperam a aplicação do estímulo elétrico (dia 24 de outubro de 2023, entre 10h24 e 14h, prédio da FAFICH-UFMG); ainda que os períodos de interrupção tenham sido curtos, eles podem interferir na contagem de *ripples* longas. Para esse mesmo animal, uma comparação entre o dia D2 e a linha de base confirma uma queda na taxa de *ripples* longas durante as 4 primeiras horas de sono, atestando a validade da interrupção (BL: 5,7037 *ripples* longas por minuto de NREM; D2: 4,5885).

É interessante notar que a ocorrência de *ripples* longas, apesar de ter sido reduzida com os estímulos elétricos, não foi completamente extinta. Um dos motivos que explicam esse resultado é o fato de que, em alguns casos, o estímulo foi aplicado já ao final da *ripple*, como mostram os exemplos na Figura 29C. Eventos de *ripple* cuja potência aumenta de forma lenta são detectados mais tardiamente, atrasando também a aplicação do estímulo. Nesses casos, não é possível afirmar que a ocorrência de uma *ripple* longa se deva à ineficácia do estímulo, mas sim ao atraso no sistema de detecção e estimulação. Somado a isso está a própria contaminação do sinal filtrado pelo estímulo, que prolonga a duração de um evento que já estava próximo do fim e faz com que ele seja considerado na contagem de *ripples* longas.

De modo geral, as análises desta seção mostram que a concentração de *ripples* no sono NREM diminui ao longo das horas de sono. Além disso, em comparação com o registro de referência, há um aumento na taxa de *ripples* nas primeiras 4 horas de sono

Figura 29 – Estimulação elétrica na VHC interrompe os eventos de *ripples*. **(A)** Exemplo de uma *ripple* interrompida pelo estímulo elétrico à esquerda e de uma *ripple* intacta à direita (animal R25, D1 e linha de base, respectivamente). As áreas em cinza compreendem o período de 1 ms antes do estímulo até 10 ms após o estímulo. Para a *ripple* estimulada, os trechos pré- e pós-estímulo do LFP filtrado foram calculados separadamente para evitar a contaminação do sinal pelo artefato de estimulação. No caso da *ripple* intacta, em que não houve estimulação, considerou-se o momento teórico de aplicação do estímulo, calculado com base na diferença média entre detecção e estimulação no dia D1 para o mesmo animal ( $26,474 \pm 0,068$  ms). **(B)** Número de *ripples* longas (duração acima de 100 ms) por minuto de sono NREM nas 4 primeiras horas de sono no registro de linha de base e no dia D1. Os pontos e/ou barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média. BL = linha de base, D1 = dia 1. **(C)** Exemplos de *ripples* cuja estimulação ocorreu após um longo período e/ou contribuiu para que fossem consideradas longas.



Fonte: elaborada pelo autor.

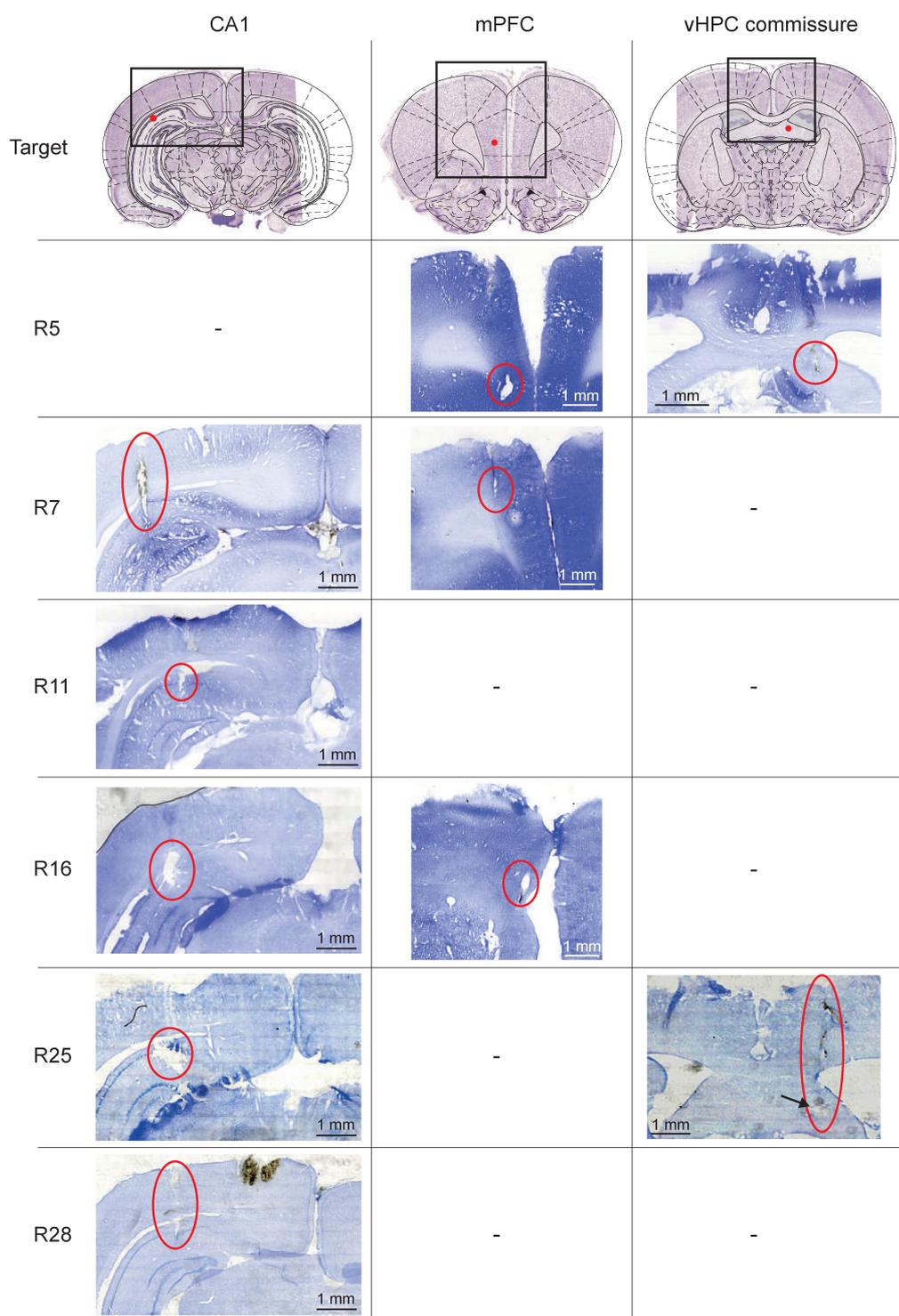
após o aprendizado no labirinto de Barnes, período que corresponde à interrupção das *ripples*. Esses resultados, juntamente com as evidências da efetividade do protocolo de estimulação, tanto reforçam os achados já presentes na literatura quanto sustentam os efeitos observados na tarefa de memória espacial.

## 9.4 Histologia

Conforme especificado na seção 8.4 dos Métodos, utilizamos o protocolo padrão para verificação histológica do posicionamento dos eletrodos. A Figura 30 apresenta imagens de fatias que incluem as regiões-alvo, com destaque para a lesão indicativa do posicionamento dos eletrodos. Tomando o conjunto das fatias inspecionadas, as imagens do hipocampo indicam que o eletrodo foi corretamente posicionado próximo à camada piramidal de CA1. As lesões no mPFC também confirmam o posicionamento do eletrodo na

região, apesar de revelarem uma maior variabilidade quanto à subárea (R5: infralímbica; R7: córtex cingulado anterior; R16: pré-límbica). Também no caso da comissura do hipocampo, as duas fatias avaliadas indicam o correto posicionamento do eletrodo nessa área. As demais análises histológicas ainda estão em andamento.

Figura 30 – Verificação histológica do posicionamento dos eletrodos. Cortes histológicos coronais evidenciando a lesão que indica o posicionamento do eletrodo nas regiões de CA1, mPFC e VHC. Na primeira linha, que contém imagens de fatias de referência, os pontos marcados em vermelho representam as coordenadas-alvo, enquanto que as áreas delimitadas pelos retângulos pretos são as exibidas nas imagens das fatias extraídas. Nas demais linhas são apresentadas as fatias de cada animal, com destaque para as lesões eletrolíticas (elipses vermelhas).



Fonte: elaborada pelo autor.

## 10 II: Discussão

A proposta desta parte do trabalho era avaliar o envolvimento causal das *ripples* na formação de memória espacial do labirinto de Barnes durante o sono. Pelo fato de esses eventos representarem uma janela de oportunidade para que as representações de memória sejam estabilizadas no neocórtex, a hipótese sob teste é a de que a perturbação seletiva das SWRs, no hipocampo, geraria também impacto nos mecanismos de consolidação subjacentes, afetando a formação de memória.

Os resultados dos experimentos com o labirinto de Barnes mostram que os animais expostos à interrupção de *ripples* apresentaram alterações na memória remota, acessada no dia D16, mas não na memória testada 24hs após a última sessão de treinamento (D5). Essas observações fornecem, pela primeira vez, a evidência de que a perturbação seletiva de SWRs durante o sono após o aprendizado, restrita a um período limitado de aquisição, gera impactos tardios, mas não recentes, na memória espacial. Além disso, as análises complementares sugerem que os efeitos comportamentais observados têm como causa exclusiva a interrupção de *ripples*, não podendo atribuí-los a alterações na estrutura do sono decorrentes da aplicação dos estímulos elétricos.

As alterações observadas na memória podem ser resultado da interrupção das reativações neuronais que ocorrem durante as SWRs, como argumentam também outros trabalhos semelhantes (GIRARDEAU et al., 2009; OLIVA et al., 2020; ALEMAN-ZAPATA; MORRIS; GENZEL, 2022). Oliva et al. (2020) mostraram, por exemplo, que a perturbação optogenética especificamente de SWRs, mas não a perturbação em instantes aleatórios, aboliu o *replay* em CA1 durante o sono. Partindo desse pressuposto, e como efeito da interrupção das reativações, a potenciação sináptica de circuitos hipocampais e/ou corticais pode ter sido afetada, prejudicando a transferência de informação entre áreas e a estabilização das representações de memória em redes corticais. Essa interpretação se encaixa na hipótese de consolidação de sistemas (SCH). O “rebote” de SWRs observado durante o período de estimulação parece representar um mecanismo compensatório, configurado ainda na etapa de aprendizado por alterações plásticas e marcação sináptica (*synaptic tagging*) dependentes de receptores NMDA (GIRARDEAU; CEI; ZUGARO, 2014). Esse “rebote” indicaria, portanto, que de fato houve perturbação das reativações sequenciais, o que pode ter sido a causa do prejuízo de memória observado.

Uma outra possível explicação para os efeitos observados na consolidação é a de que a interrupção das SWRs tenha afetado a redução generalizada dos pesos sinápticos durante o sono, como indicam os achados de Norimoto et al. (2018). De acordo com a hipótese da homeostase sináptica (SHY), essa renormalização sináptica é necessária para que a consolidação da memória ocorra de maneira adequada. Com análises complementares

futuras, em especial as que se debruçam sobre marcadores de homeostase sináptica, será possível determinar o modelo que melhor explica os fenômenos observados ou mesmo validar uma abordagem conjunta, que inclua aspectos tanto da SHY quanto da SCH. Nesse caso, as SWRs e as reativações, ao mesmo tempo em que promoveriam LTP para fortalecer sinapses relevantes, facilitariam a depressão sináptica generalizada e o aumento da relação sinal/ruído da rede.

O que explicaria a manutenção seletiva da memória recente (24hs), mas não a remota? Uma hipótese é a de que a perturbação de SWRs pode ter impactado a distribuição e estabilização das representações de memória nas redes corticais em um momento crítico para isto, mas as manteve ainda ancoradas nos circuitos hipocâmpais até, pelo menos, o primeiro dia de teste (D5). Outra hipótese envolve a participação do sono REM em um processo global, integrado e sequencial de consolidação durante o sono. A interrupção das SWRs, ainda durante o sono NREM, pode ter gerado alterações seletivas na dinâmica de diferentes processos moleculares e celulares que ocorrem durante o REM subsequente e que contribuem para a consolidação. Como sugerem alguns estudos ([ALMEIDA-FILHO; QUEIROZ; RIBEIRO, 2018](#)), a realocação das representações de informação em diferentes estruturas cerebrais é feita de maneira progressiva, sendo modulada por mecanismos moleculares que ocorrem durante o REM.

## 10.1 Aprendizado no labirinto de Barnes: diálogo com outros trabalhos

### 10.1.1 Aspectos comportamentais

Considerando-se apenas o grupo controle, os animais apresentaram uma evolução no desempenho da tarefa comparável à reportada em trabalhos anteriores no laboratório ([RêGO, 2014](#); [BERALDO, 2024](#)). Na etapa de aquisição, [Rêgo \(2014\)](#) observou uma redução significativa na latência para entrada no escape e na distância percorrida, enquanto [Beraldo \(2024\)](#), além de reforçar esses achados, também apontou redução no número de erros primário e secundário e aumento no uso da estratégia direta. Confirmando o aprendizado dos animais, os dois autores observaram uma preferência pelo quadrante-alvo na etapa de teste (composta apenas pelo D5). Ainda que no presente trabalho o número de sessões diárias tenha sido reduzido para 3 com a intenção de atrasar a curva de aprendizado dos animais, essa alteração não impediu que fossem encontradas diferenças significativas nas mesmas métricas de desempenho entre os dias D1 e D4 do período de aquisição. A preferência evidente pelo quadrante-alvo no teste do dia D5 também indica que a etapa de treinamento foi capaz de induzir a formação de memória espacial nesses animais. Em conjunto, todos esses resultados atestam a reprodutibilidade do protocolo do labirinto de Barnes no laboratório, cujos achados estão também alinhados com os de outros grupos

de pesquisa (HARRISON et al., 2006; NEGRÓN-OYARZO et al., 2018; BINDER et al., 2019; GAWEL et al., 2019; GE et al., 2023).

No que diz respeito ao grupo submetido à interrupção das *ripples*, os únicos indicadores de aprendizado na etapa de aquisição vieram da análise intragrupo, que revelou aumento da velocidade média e redução da distância percorrida (Figuras 15C e D). Mesmo que o número de variáveis indicativas de aprendizado durante o treinamento tenha sido reduzido, os animais apresentaram uma clara preferência pela exploração do quadrante-alvo no dia D5, marcada tanto pelo tempo despendido na região quanto pelo número efetivo de exploração das saídas (Figuras 17 e 20). O mesmo comportamento não foi observado no dia D16, indicando que a interrupção de *ripples* durante o sono pós-aprendizado impacta a formação de memória remota, mas não aquela testada 24 horas após a última sessão de aprendizado.

De forma muito interessante, esses últimos resultados dialogam com alguns dos obtidos por Binder et al. (2019). O trabalho realizado por eles foi o único encontrado até a presente data que testa a manipulação da via hipocampo-mPFC durante o sono pós-aprendizado no labirinto de Barnes. Os autores aplicaram o teste do labirinto de Barnes em camundongos e, durante o sono NREM subsequente, inibiram optogeneticamente os terminais axonais das projeções do hipocampo no mPFC, mas de maneira não associada às *ripples*. Durante a fase de treinamento, tanto os animais controle quanto os animais submetidos ao silenciamento optogenético apresentaram redução da latência, do erro primário e da distância, mas um aumento no uso da estratégia direta só foi observado no grupo controle. Os autores então analisaram o número de *head dips* dos dois grupos na etapa de teste, que ocorreu nos dias D5 e D16. Os resultados comportamentais observados foram, em certa medida, contrários aos obtidos no presente trabalho: no dia D5, apenas o grupo controle apresentou preferência por explorar a saída onde antes havia o escape, enquanto que no dia D16 ambos os grupos apresentaram preferência pela sondagem dessa mesma saída em relação às demais. Os pesquisadores sintetizam os achados, dizendo que “o silenciamento durante SWS prejudica seletivamente a memória recente, mas não a memória remota, na ausência de efeitos na taxa de erro e nas latências de escape”<sup>1</sup>.

Entretanto, é preciso ter cautela antes de se realizar uma comparação entre este trabalho e o de Binder et al. (2019). São inúmeras as variações entre as condições experimentais empregadas nos dois estudos. Elas vão desde o modelo animal utilizado, passando pelas características do protocolo do BM (número de orifícios do labirinto, quantidade de sessões diárias de aquisição e o intervalo entre elas, etc.), até a forma de se calcular algumas das métricas de desempenho. Entretanto, a que parece ser a mais fundamental para explicar as diferenças nos resultados é o tipo de intervenção experimental realizada. Diferentemente deste trabalho, em que a perturbação elétrica atingiu especificamente a

<sup>1</sup> “[...] silencing during SWS selectively impaired recent but not remote memory in the absence of effects on error rate and escape latencies.”

atividade hipocampal associada às *ripples*, a manipulação optogenética empregada por Binder et al. (2019) atingiu os terminais hipocampais que chegam no mPFC de forma temporalmente inespecífica, aplicada durante todo o período de sono NREM identificado nas 3 primeiras horas de registro.

Algumas características da intervenção realizada por Binder et al. (2019) dificultam uma comparação direta entre os resultados obtidos pelos autores e os encontrados neste trabalho. A primeira delas é que tal manipulação, por ser menos específica temporalmente, pode ter interferido em outros processos neurofisiológicos atuantes durante o sono NREM e que impactam de maneira distinta a consolidação de memórias remotas e de memórias mais recentes. Portanto, é difícil isolar os efeitos de uma perturbação das reativações que ocorrem durante as *ripples* daquilo que é resultado de outros processos. Outro aspecto diz respeito às regiões envolvidas: ainda que os inputs do hipocampo no mPFC tenham sido silenciados, as projeções hipocampais para outras regiões conectadas com o mPFC e relacionadas com a consolidação de memórias dependentes do hipocampo foram mantidas intactas. Nesse caso, e ao contrário da intervenção centralizada na atividade hipocampal subjacente às *ripples*, os efeitos das reativações hipocampais se propagariam para essas outras regiões, potencialmente atingindo a circuitaria do mPFC de forma indireta. Os próprios autores discutem que vias como a HPC-entorrinal-mPFC (KITAMURA et al., 2017) e as que têm como intermediário o núcleo reuniens do tálamo (LOUREIRO et al., 2012) podem contribuir para a consolidação de diferentes aspectos da tarefa.

De maneira geral, esse conjunto de evidências reforça a hipótese da existência de mecanismos independentes e paralelos de consolidação de memória recente e remota, ainda que um certo grau de sobreposição entre eles não possa ser descartado (IZQUIERDO et al., 1999; CAMINA; GÜELL, 2017). Na importante revisão de Izquierdo et al. (1999), os autores trazem uma série de trabalho cujos resultados sustentam a diferenciação entre os mecanismos de formação de três tipos de memória: memória de trabalho (MT; imediata, poucos segundos ou minutos), memória de curto prazo (MCP; duração de várias horas) e memória de longo prazo (MLP; consolida-se lentamente e é relativamente permanente). De acordo com os autores, “o conceito popular de que a memória de curto prazo é apenas uma etapa de passagem para a de longo prazo é errado; assim como é a ideia de que a memória de trabalho pode de alguma forma constituir um tipo de memória de curto prazo. Nesse ponto, é seguro afirmar que MT, MCP e MLP pertencem e são reguladas por subsistemas separados do cérebro [...]”<sup>2</sup>. Trabalhos posteriores e publicados até mais recentemente continuam a fornecer evidências a favor dessa hipótese (YOON et al., 2008; KIM et al., 2024; SHIN; PARRA-BUENO; YASUDA, 2024).

<sup>2</sup> “The popular concept that STM is just a passageway to LTM certainly is wrong; as is the idea that WM may in any way constitute a sort of STM. At this stage it is safe to say that WM, STM and LTM pertain to and are regulated by separate subsystems of the brain [...]”

### 10.1.2 Arquitetura do sono pós-aprendizado

Alguns trabalhos na literatura reportam aumento no tempo de sono NREM (TAKASHIMA et al., 2006; HELLMAN; ABEL, 2007) e REM (VERTES; EASTMAN, 2000; DATTA, 2000; FOGEL; SMITH; COTE, 2007; PETERS; SMITH; SMITH, 2007) após a execução de tarefas que demandam a formação de memórias declarativas e procedurais. Hellman e Abel (2007), por exemplo, observaram um acréscimo de 1 hora no tempo despendido em sono NREM após uma única exposição de camundongos à tarefa de medo condicionado. Outros estudos, no entanto, não relataram alterações nos tempos despendidos em cada estado, apesar de alguns deles apontarem mudanças em outras características do sono (SMITH; NIXON; NADER, 2004; BINDER et al., 2019; POLANCZYK, 2023). É difícil tirar conclusões mais generalistas sobre a relação entre o tempo em um estado específico de sono e a formação de memória sem considerar a infinidade de outras variáveis envolvidas. Por exemplo, como apontado por Fogel, Smith e Cote (2007), as alterações na duração de cada estágio do sono variam substancialmente a depender do tipo de tarefa que o precede.

No caso do labirinto de Barnes, o presente trabalho não detectou alterações no tempo total despendido em cada estado (vigília, sono NREM e sono REM) nos registros pós-aprendizado em comparação com a linha de base (Figura 23). Fazendo um paralelo com o trabalho de Beraldo (2024), que também não encontrou diferenças desse tipo em animais livres de qualquer manipulação, esse resultado reforça as evidências já apresentadas na seção 9.2 de que a estimulação elétrica foi inócua para a geração de mudanças macroestruturais no sono. Um outro trabalho que poderia confirmar ou refutar esses achados é o de Binder et al. (2019), mas os autores apresentam apenas uma comparação entre grupos, e não entre a linha de base e os dias de aquisição.

Uma análise da dinâmica do tempo despendido em cada estado ao longo das horas de registro pós-aprendizado revelou, de maneira global, um aumento gradual em sono REM e uma redução no estado de vigília (Figura 23). No sono NREM, entretanto, não foram detectadas variações significativas. Esse aumento de tempo em sono REM também foi encontrado por Beraldo (2024), assim como a redução no tempo em vigília. Tomados em uma perspectiva conjunta, esses resultados indicam que as dinâmicas dos estados de REM e vigília também não foram afetadas pela perturbação de *ripples*, que constitui a principal diferença entre os protocolos experimentais dos dois trabalhos. Porém, no caso do sono NREM, um acréscimo brusco a partir da primeira hora foi observado no trabalho de Beraldo (2024), seguido de uma tendência que sugere uma leve queda. Há que se investigar se essa diferença na dinâmica do sono NREM corresponde, efetivamente, ao impedimento de algum mecanismo homeostático causado pela interrupção das *ripples*, em linha com os achados de Norimoto et al. (2018), ou se ela é apenas resultado de considerações metodológicas diferentes: enquanto neste trabalho o período de análise começa a partir

do primeiro episódio de sono, no de [Beraldo \(2024\)](#) ele começa a partir do início do registro, quando o animal ainda está acordado. É importante verificar se o deslocamento temporal dos dados não seria a razão dessa diferença.

Em relação ao número de *bouts*, indicativo de fragmentação do sono, alguns trabalhos têm mostrado uma relação tanto correlacional ([DJONLAGIC et al., 2012](#); [OKUDA et al., 2021](#)) quanto causal ([ROLLS et al., 2011](#); [LIU et al., 2019](#)) dessa métrica com prejuízos na consolidação de memórias. [Rolls et al. \(2011\)](#), por exemplo, mostram que a fragmentação do sono em camundongos gerada pela manipulação optogenética de neurônios hipocretinérgicos e orexinérgicos após uma tarefa de reconhecimento de objetos reduziu o desempenho dos animais no dia seguinte. O protocolo de fragmentação empregado pelos autores não promoveu alterações nem no tempo total de sono nem nos tempos despendidos em REM e NREM. [Baud, Magistretti e Petit \(2015\)](#) atribuem os efeitos da fragmentação de sono à falha em entrar em estágios de sono mais profundos, os quais são necessários para os benefícios cognitivos do sono.

Neste trabalho não foram encontradas alterações no número total de *bouts* em nenhum dos estados do ciclo sono/vigília após a aquisição no labirinto de Barnes, indicando que a combinação dos fatores aprendizado e perturbação de *ripples* via estimulação elétrica não resultaram em fragmentação do sono. Essa conservação da taxa de *bouts* no estado de vigília contrasta apenas com um aumento pontual encontrado por [Beraldo \(2024\)](#) no dia D1. O próprio autor discute que, apesar de tal aumento indicar uma maior fragmentação do sono no primeiro dia da tarefa, ela não se traduziu em prejuízo no desempenho dos animais.

Outro resultado encontrado neste trabalho é a tendência de aumento no número de *bouts* de sono REM ao longo das horas nos registros pós-treinamento. Em conjunto com os dados da Figura 23H, que mostram um aumento também no tempo de sono REM, tal tendência parece estar mais associada ao incremento natural dos episódios de sono REM ao longo da segunda metade do período claro do que a algum tipo de fragmentação causada pelo estímulo elétrico. Essa ideia pode ser corroborada com os achados de [Simasko e Mukherjee \(2009\)](#), que caracterizaram o ciclo sono/vigília de ratos Sprague-Dawley em condições de controle. Os autores relatam um aumento do tempo em sono REM entre as horas iniciais e finais do período claro, acompanhado de uma redução na duração dos episódios de REM. Ou seja, se os intervalos são mais curtos mas o tempo total aumenta, o resultado é que também o número de episódios (*bouts*) cresce ao longo do tempo. A dúvida que resta é com relação ao registro de linha de base, em que essa tendência de aumento não foi confirmada. Nesse caso, a ausência de diferença estatisticamente significativa pode ser explicada pela alta variabilidade dos dados, e o incremento do tamanho amostral em experimentos futuros pode ajudar a confirmar ou não esse resultado.

Por fim, reforçando os resultados obtidos no presente estudo, os trabalhos de per-

turbação de *ripples* que analisaram os efeitos da estimulação elétrica na estrutura do sono também não relataram alterações causadas por esse tipo de intervenção (GIRARDEAU et al., 2009; EGO-STENGEL; WILSON, 2010). Girardeau et al. (2009) mostram que a razão REM/NREM dos tempos despendidos nesses estados se manteve a mesma nos grupos controle (estimulação atrasada) e interrupção de *ripples*, sendo que apenas esse último apresentou prejuízo de memória. Já no estudo de Ego-Stengel e Wilson (2010), os parâmetros analisados foram o número e a duração dos episódios de sono REM em um intervalo de 1 hora.

### 10.1.3 Ocorrência e duração das *ripples*

Os trabalhos de Binder et al. (2019) e de Beraldo (2024) avaliaram as características de atividades oscilatórias e de marcadores eletrofisiológicos envolvidos no processamento de memória após a aquisição no BM. Em relação às *ripples*, especialmente, os dois estudos reportaram aumento na densidade de eventos (eventos por minuto de sono NREM) no primeiro dia de aquisição em relação ao registro de linha de base. Esse aumento de *ripples* após o aprendizado já é bem documentado na literatura para outros tipos de tarefas e, em alguns casos, está associado também a um maior desempenho (ESCHENKO et al., 2008; RAMADAN; ESCHENKO; SARA, 2009; GIRARDEAU; CEI; ZUGARO, 2014; NORIMOTO et al., 2018; BINDER et al., 2019).

No presente trabalho, foi observado um aumento na ocorrência de *ripples* após o aprendizado durante as 4 primeiras horas de registro, que coincidem com o período de estimulação elétrica e de interrupção dessas oscilações. Resultados similares foram encontrados em trabalhos anteriores de perturbação de *ripples* (GIRARDEAU; CEI; ZUGARO, 2014) e de silenciamento da via HPC-mPFC durante o sono NREM (BINDER et al., 2019). Curiosamente, o aumento de *ripples* em resposta à própria interrupção desses eventos é observado apenas depois de atividades que resultam efetivamente em aprendizado, tais como uma tarefa de memória espacial ou a exploração de um novo ambiente, mas não em condições controle de não-aprendizado como a exploração de um ambiente familiar, por exemplo (GIRARDEAU; CEI; ZUGARO, 2014; BINDER et al., 2019). Experimentos farmacológicos indicam que esse fenômeno compensatório é dependente da atividade de receptores NMDA durante o aprendizado, que possivelmente atuam “marcando” as redes mais relevantes e promovendo alterações plásticas que depois servirão para regular a consolidação mediada pelas *ripples* (GIRARDEAU; CEI; ZUGARO, 2014).

Se tanto o aprendizado no BM quanto a interrupção das *ripples* no sono subsequente potencializam a taxa de *ripples*, qual seria a parcela de contribuição de cada um desses fatores no aumento observado em relação à linha de base? Para responder a essa pergunta, e já como sugestão de trabalhos futuros, uma das maneiras seria adicionar ao conjunto de experimentos um grupo controle *sham*. Trata-se de animais implantados,

submetidos ao mesmo protocolo de aprendizado no labirinto, mas que não recebem nenhum estímulo elétrico durante o sono, de forma que as *ripples* sejam mantidas intactas. Nesse caso, um provável aumento na taxa de *ripples* semelhante ao observado por Beraldo (2024) seria resultado exclusivo do aprendizado. O que impede a comparação direta com os dados obtidos por esse autor são algumas diferenças no protocolo do BM (número de sessões diárias) e na quantidade e local dos eletrodos inseridos.

Outro resultado interessante obtido por Beraldo (2024) foi o aumento na ocorrência de *ripples* longas ( $> 100$  ms) durante o sono após a aquisição do dia D1 em relação ao registro de referência. Esse aumento apresentou uma correlação positiva com o tempo de exploração do quadrante-alvo no primeiro minuto da sessão de teste do dia D5, indicando uma formação mais consistente de memória do local do escape. Em linha com esse resultado, alguns trabalhos têm mostrado uma associação entre o desempenho em tarefas que demandam a formação de memória dependente do hipocampo e o aumento da duração das *ripples* durante o sono pós-aprendizado (ESCHENKO et al., 2008) ou mesmo durante a execução da tarefa (FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2019). Fernández-Ruiz et al. (2019), por exemplo, usaram um sistema de manipulação optogenética em malha fechada para prolongar a duração das *ripples* durante o aprendizado em um labirinto “M” e, com isso, aumentar o desempenho dos animais na tarefa.

Neste trabalho, apesar de não ter sido possível quantificar a duração natural das *ripples* depois do aprendizado em razão justamente do protocolo de interrupção, foi observada uma redução na taxa de *ripples* longas já no dia D1 em comparação com a linha de base. Essa evidência de “encurtamento” das *ripples* e os efeitos comportamentais decorrentes da estimulação elétrica encontram sustentação nos achados dos trabalhos mencionados anteriormente. Isto é, a interrupção das *ripples* parece não apenas ter impedido o aumento natural de *ripples* longas pós-aprendizado, que estariam associadas à promoção da consolidação, mas também promoveu uma redução em relação aos níveis basais.

## 10.2 Decaimento na taxa de SWRs ao longo das horas e homeostase sináptica

Ainda em relação à ocorrência de SWRs (*ripples* por minuto de NREM), foi observada uma tendência de queda gradual ao longo das horas de registro (Figuras 27C e D). Esse mesmo decaimento foi reportado no trabalho de Beraldo (2024), que também observou uma tendência semelhante em relação à ocorrência de eventos delta no mPFC e à potência de oscilações lentas, tanto no mPFC quanto na região de CA1, do hipocampo. A queda gradual na ocorrência de *ripples* e na potência de oscilações lentas ao longo do sono encontra respaldo na hipótese de homeostase sináptica (SHY).

Desde o início da elaboração da SHY, é proposto que o decaimento das oscilações lentas está associado ao processo gradual de renormalização dos pesos sinápticos fortalecidos durante a vigília, especialmente quando há experiências de aprendizado (TONONI; CIRELLI, 2003; VYAZOVSKIY et al., 2008; CIRELLI; TONONI, 2022). Mais recentemente, ao reportar que as SWRs atuam na redução dos pesos sinápticos da circuitaria hipocampal durante NREM, o trabalho de Norimoto et al. (2018) integra tais eventos ao arcabouço da SHY. Portanto, nesse cenário, o decaimento de SWRs pode ser um reflexo do processo gradual de depressão sináptica da rede promovido em conjunto com as oscilações lentas. O que os resultados do presente trabalho indicam, no entanto, é que essa dinâmica se manteve, mesmo diante da perturbação das *ripples* e do consequente prejuízo na formação de memória remota. Portanto, e com base apenas nas análises realizadas neste trabalho, mesmo que as *ripples* estejam associadas ao mecanismo de homeostase sináptica que dá suporte ao aprendizado, o prejuízo observado na consolidação da memória remota talvez não possa ser explicado por esse processo. Análises futuras, incluindo as de oscilações lentas no hipocampo e no mPFC, são necessárias para a compreensão mais ampla dessa questão.

### 10.3 Preferência do grupo perturbação de *ripples* pelo quadrante oposto

Em relação ao tempo despendido em cada região do labirinto no dia D16, o aumento gradual da preferência pelo quadrante oposto no grupo perturbação de *ripples* é intrigante e enseja a formulação de perguntas e hipóteses. Qual a razão da preferência pelo quadrante Q3, e não de outro? A primeira hipótese é a de que haveria pistas olfativas na borda do antigo escape que estivessem atraindo os animais até lá. Um dos procedimentos realizados antes das sessões de teste para evitar que possíveis pistas olfativas guiassem os animais até a posição do escape foi rotacionar a plataforma do labirinto em 180°. Logo, a antiga saída de escape, agora tampada em sua parte inferior da mesma forma que as demais saídas, passou a ser localizada no quadrante Q3. Entretanto, considerando que o procedimento de higienização do labirinto foi o mesmo em todas as sessões, essa hipótese pode ser descartada com base nos dados apresentados na Figura 17: os animais controle não apresentaram preferência pelo quadrante oposto no dia D16; além disso, no dia D5, ambos os grupos exploraram preferencialmente o quadrante Q1, indicando que a trajetória até o escape foi guiada via memória espacial, não olfativa.

Outra hipótese é a de que os animais submetidos à interrupção de *ripples* não formaram memória nem da localização do escape, como evidenciam os dados de tempo despendido e de *head dips*, nem de que havia um escape no labirinto. Nesse sentido, começaram por explorar o labirinto ao acaso e gradualmente foram apresentando preferência pelo quadrante Q3, que é o mais próximo do local onde ficava a caixa trazida do bioté-

rio. As pistas olfativas e/ou visuais da localização da caixa poderiam indicar um possível refúgio do ambiente aversivo do labirinto. Os animais controle, por apresentarem ainda algum resquício de memória da localização e da existência do escape, como evidenciam os dados de *head dips* (Figura 20), despenderam tempo também nas demais áreas do labirinto em busca do escape. Uma das formas de se prosseguir no teste dessa hipótese seria, por exemplo, alterar a localização da caixa do biotério e avaliar se o grupo perturbação de *ripples* ainda apresentaria preferência pelo quadrante mais próximo dela.

## 10.4 Perspectivas futuras: experimentos complementares com o BM

Uma importante frente de continuidade deste trabalho é aumentar o tamanho amostral, tanto para o grupo controle quanto para o grupo com interrupção de *ripples*. O número de animais utilizados (8 para o grupo controle e 6 para o grupo perturbação de *ripples*) fornece dados bastante promissores de prejuízo da consolidação, mas que poderão ter sua robustez aumentada por meio de um acréscimo na quantidade de animais sob experimentação. Esse acréscimo pode ser importante tanto para reforçar os alguns achados deste trabalho quanto para revelar potenciais diferenças sutis entre os grupos, em especial no que se refere às métricas de desempenho no labirinto.

Outro avanço necessário e que já começou a ser realizado no laboratório são os experimentos com aplicação tardia do estímulo elétrico. Ou seja, os animais que constituem esse grupo controle adicional passam pelas mesmas etapas dos protocolos a que foram submetidos os animais do grupo de perturbação de *ripples*, com a diferença de que o estímulo elétrico é aplicado com atraso após a detecção das *ripples*. A intenção é diferenciar os efeitos da aplicação do estímulo elétrico em si daqueles que resultam da interrupção efetiva das *ripples* e do mecanismo subjacente de *replay*. Esse tipo de grupo controle foi introduzido já no primeiro trabalho de supressão de *ripples* descrito na literatura (GIRARDEAU et al., 2009) e também adotado por outros publicados posteriormente, que abordam tanto a interrupção de *ripples* quanto a intervenção em outras áreas, mas cujo gatilho é a detecção dessas oscilações (ver Aleman-Zapata, Meij e Genzel (2022)).

Ainda no conjunto de experimentos complementares com o labirinto de Barnes, outro grupo que começou a ser testado no laboratório é o *sham*. Ele é composto por animais que foram implantados da mesma maneira que os submetidos aos experimentos de perturbação de *ripples*, mas que não receberam nenhum tipo de estímulo elétrico após a detecção dessas oscilações. A importância desse grupo se justifica pela necessidade de identificar os possíveis efeitos comportamentais causados pelo procedimento cirúrgico e pela inserção do implante em si, sem nenhum tipo de manipulação com estímulo elétrico. Além disso, a análise dos eventos eletrofisiológicos desse grupo pode permitir a mensuração

da parcela de contribuição que o fator aprendido, de forma isolada, possui no aumento de *ripples* durante o sono subsequente à aquisição. Os dados desses animais ainda estão em processo de coleta e análise e, até o momento de escrita desta tese, são insuficientes para que se tire qualquer conclusão.

O último grupo, também já em andamento no laboratório, busca investigar e diferenciar o grau de aprendizado espacial baseado nas pistas visuais distais da sala (navegação aloccêntrica) daquele que se apoia em outras estratégias, tais como as dependentes de informação olfativa ou de regras autorreferenciadas que possuam uma parcela de aprendizado motor, do tipo “vá até a borda do labirinto e então siga no sentido anti-horário”. Com essa intenção, e também visando a criação de um controle negativo, foram realizados alguns experimentos iniciais que consistiram na rotação da plataforma do labirinto de maneira aleatória a cada sessão, de modo que o escape era sempre posicionado em um local diferente daquele em que se encontrava anteriormente. A ideia por trás dessas alterações sucessivas é impedir a formação de memória da posição do escape com base no mapeamento espacial da sala. O que foi observado, ainda que de forma preliminar (3 animais), é que a latência para encontrar o escape diminuiu ao longo dos dias, mas o uso crescente da estratégia serial foi predominante em relação às demais. Esses dados sugerem uma separação entre a memória da existência do escape no labirinto, ainda que em posições variadas, e a memória de sua localização específica.

São várias as possibilidades de estudos futuros que buscam investigar os processos neurofisiológicos específicos por trás de cada uma das estratégias empregadas. De acordo com [Grech, Nakamura e Hill \(2018\)](#), ainda que a ausência de pontos de escolha no labirinto de Barnes incentive a adoção de estratégias aloccêntricas, há evidências sugerindo que estratégias egocêntricas podem também ser utilizadas. Em uma breve revisão, os autores citam trabalhos cujas evidências apontam que os mecanismos neurofisiológicos subjacentes a esses dois tipos de aprendizado são distintos, ainda que não pareçam ser mutuamente exclusivos ([EKSTROM; ARNOLD; IARIA, 2014](#)). Experimentos de interrupção das *ripples* em cenários variados podem ajudar a elucidar os mecanismos neurais por trás do aprendizado e do uso das diferentes estratégias de navegação.

## Parte III

Preparação dos experimentos de manipulação  
cortical em malha fechada usando  
optogenética

# 11 III: Introdução

Os experimentos de interrupção de *ripples* durante o sono pós-aprendizado atestam o papel causal que essas oscilações desempenham no aprendizado espacial do labirinto de Barnes. É bem provável que o mecanismo de consolidação mediado pela interação entre hipocampo e córtex também atue nesse caso, envolvendo a fina sincronia temporal entre as *ripples* e as oscilações delta e *spindle* no mPFC. A proposta desta Parte 3 do trabalho é diferente das anteriores: com um caráter mais metodológico, ela busca documentar as tentativas iniciais de preparação e padronização das técnicas que serão utilizadas nos experimentos de perturbação cortical após a ocorrência de *ripples*. Com isso será possível testar a hipótese central que motivou a realização deste trabalho: a de que essa perturbação, por prejudicar os processos de plasticidade neuronal e o fluxo de informações hipocampo-córtex, resulta em redução na consolidação da memória durante o sono.

## 11.1 Manipulação cortical em malha fechada com optogenética

A manipulação do mPFC logo após a ocorrência de *ripples* pode ser feita de diversas maneiras. Algumas delas são por meio de abordagens farmacológicas, que acabam se tornando impraticáveis pela dificuldade de se interferir na atividade neural de forma temporalmente seletiva, em um intervalo curto e preciso. Por se tratar da perturbação de atividades específicas como delta e *spindle*, é necessária uma intervenção cujo início se dê rapidamente, na escala de dezenas ou centenas de milissegundos, e que também cesse com agilidade. Quaisquer intervenções que não atendam a esses requisitos correm o risco de gerar impacto em outros mecanismos fisiológicos operantes durante o sono, e cujo possível efeito na consolidação de memória possa ser erroneamente atribuído à perturbação de delta e *spindle*.

A estimulação elétrica, em contraposição à abordagem farmacológica, pode ser realizada em momentos bastante específicos e controlados. Porém, alguns inconvenientes dessa técnica são a baixa resolução espacial e a inespecificidade em relação ao tipo celular. Soma-se a isto a incerteza quanto ao padrão estimulatório a ser aplicado capaz de impactar a atividade oscilatória e prejudicar a consolidação de memória. O trabalho de [Cota et al. \(2021\)](#), ainda que esteja inserido em outro contexto de pesquisa, é um exemplo interessante de como alterações no padrão e na distribuição dos estímulos elétricos podem gerar efeitos bastante distintos em animais modelo de epilepsia.

A técnica de optogenética se apresenta como uma boa alternativa às intervenções farmacológicas ou por estimulação elétrica, capaz de fornecer maior precisão espacial, temporal e celular ([YIZHAR et al., 2011](#)). Como o próprio termo sugere, essa técnica se

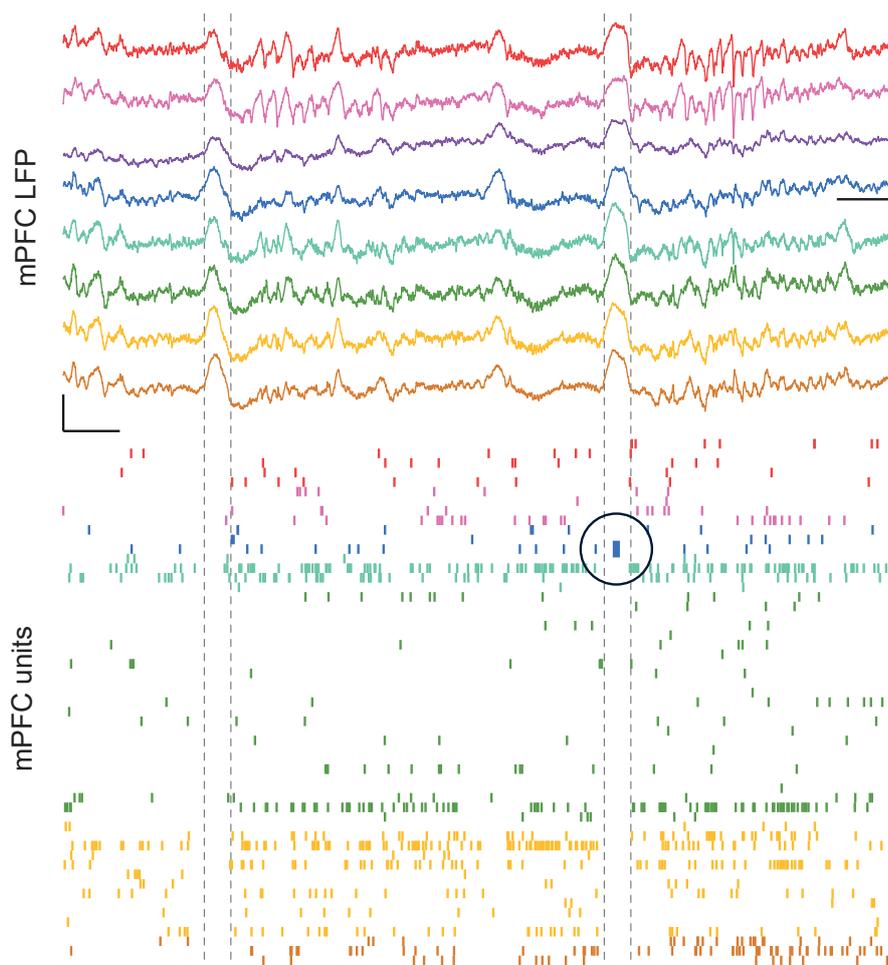
utiliza da integração de tecnologias ópticas e genéticas para promover ganho ou perda de função de eventos bem definidos dentro de células específicas (YIZHAR et al., 2011). Por exemplo, o controle óptico dos potenciais de ação de neurônios de um tipo específico pode ser realizado a partir da introdução de genes de opsinas microbianas. Como consequência da expressão desses genes, torna-se possível manipular o potencial de membrana dos neurônios de forma temporalmente precisa por meio da incidência de luz. A região de manipulação fica restrita ao alcance do estímulo luminoso, comumente conduzido por uma fibra óptica posicionada próximo da coordenada-alvo, e os neurônios afetados se limitam àqueles em que houve expressão da opsina.

No caso da perturbação dos eventos corticais delta e *spindle* com a técnica de optogenética, há que se decidir o tipo neuronal a ser manipulado e as características da opsina que deverá ser expressada. Tal decisão depende da composição celular da região-alvo (mPFC) e da dinâmica das atividades unitárias que ocorrem durante esses eventos. Em termos de composição celular, o mPFC é formado predominantemente por neurônios piramidais excitatórios, que representam cerca de 80 a 90% do total (XU et al., 2019). Os outros 10 a 20% são compostos por interneurônios GABAérgicos de diversos tipos: parvalbumina-, somatostatina- e colecistoquinina-positivos, além de interneurônios que expressam o peptídeo intestinal vasoativo (KAWAGUCHI, 1997; GABBOTT et al., 1997; XU et al., 2019).

Já no que diz respeito à atividade neuronal subjacente às ondas delta, especificamente, o trabalho de Todorova e Zugaro (2019) mostra que elas não representam períodos de absoluto silêncio das redes do mPFC, como se admitia até então (Figura 31). Em 12% dos eventos de delta foi detectada atividade unitária consistente de alguns poucos neurônios, enquanto a maioria restante permanecia em silêncio. Não obstante, a atividade dessa parcela reduzida de neurônios parece não representar mero ruído neuronal, mas sim parte do processamento de informação neuronal que dá suporte à consolidação de memória. Os autores propõem que o silêncio sincronizado da maior parte do córtex, marcado pelas ondas delta, isola a rede da competição por estímulos de entrada enquanto uma seleta subpopulação de neurônios mantém padrões de disparo relevantes, alternando entre épocas de transferência de informação hipocampo-córtex e épocas de plasticidade e reorganização da rede cortical.

Considerando-se esse contexto, uma proposta inicial de experimento que busque testar o papel causal das oscilações corticais acopladas com *ripples* na consolidação de memória começa por induzir, via inibição optogenética, o silenciamento dos neurônios excitatórios do mPFC após a ocorrência de *ripples*. A ideia por trás dessa intervenção é atingir as subpopulações de neurônios que estão ativas durante delta e que participam do processo de consolidação, conforme revelado no trabalho de Todorova e Zugaro (2019).

Figura 31 – Disparos seletivos durante delta. Exemplo de onda delta não silente. As curvas coloridas indicam LFPs registrados em diferentes canais no mPFC. As barras verticais indicam os potenciais de ação emitidos por unidades neuronais e registrados simultaneamente. A cor dos disparos de um dado neurônio representa o canal a partir do qual aquele neurônio foi identificado. As linhas verticais tracejadas indicam o início e o fim de ondas delta. Disparos seletivos foram registrados durante a segunda onda delta (circulo preto), enquanto o restante da rede permaneceu em silêncio. Barras de calibração: 0,5 s (horizontal) e 1 mV (vertical).



Fonte: Todorova e Zugaro (2019).

## 11.2 Implante fibra-eletrodo: transferência de tecnologia e redução de custos

Um dos pontos centrais desta Parte III trata da construção do implante intracraniano que permitirá realizar a inibição optogenética dos neurônios do mPFC e, de forma simultânea, registrar a atividade eletrofisiológica nessa mesma região. A grande particularidade deste implante é que a fonte de luz, um pequeno LED (do inglês, *light-emitting diode*) de alto brilho, é acoplada diretamente à cabeça do animal. Ao contrário dos *setups* tradicionais, em que a fibra óptica se estende desde o equipamento gerador da fonte de

luz até a cabeça do animal (SPARTA et al., 2012), esse implante é acionado por meio de condutores elétricos comuns (fios de cobre, por exemplo). Por isso, o meio de condução do comando de inibição/ativação é mais flexível e menos sujeito a quebrar, como ocorre com a fibra óptica. Essa característica torna-se uma vantagem em contextos de grande movimentação do animal e em tarefas espacialmente extensas. Ainda que nos experimentos de manipulação cortical durante o sono a intervenção optogenética ocorra em um período de baixa atividade motora do animal e em espaço reduzido, o uso de um implante com essas características é bastante justificável: sua construção, implantação e teste representam uma boa oportunidade para ampliar as perspectivas e possibilidades de experimentos futuros no laboratório, principalmente daqueles que busquem investigar o papel causal de atividades neurais específicas durante o aprendizado.

A construção e o aprimoramento deste implante são alguns dos vários resultados da experiência obtida com o doutorado sanduíche no laboratório do Dr. Michaël Zugaro, no Collège de France, em Paris, na França (PRPG 01/2021, processo 23072.205129/2021-05, CAPES/PrInt), e contaram com a ajuda fundamental dos pesquisadores Dr. Guillaume Dugué e Dr. Thomas Pujol (École Normale Supérieure de Paris - ENS PSL). A confecção e o uso do implante em experimentos no laboratório concretizam uma transferência de tecnologia bastante promissora, em especial por apresentar um custo reduzido em comparação com os modelos comerciais existentes. Nesse sentido, e com o objetivo de servir como um guia para os colegas do LANECS e de outros laboratórios, a seção de Resultados descreve com detalhes o passo-a-passo da construção do implante e apresenta algumas recomendações práticas.

## 12 III: Objetivos

Os objetivos desta Parte III do trabalho são:

- 1) documentar as etapas de construção do implante intracraniano para registro eletrofisiológico e manipulação optogenética;
- 2) realizar a infusão do vetor viral em dois animais-piloto e verificar a expressão da opsina inibitória (ArchT) após os testes com o sistema de registro e estimulação;
- 3) implantar o conjunto fibra-eletrodo nos dois animais-piloto e realizar testes preliminares do sistema de manipulação optogenética em malha fechada.

## 13 III: Métodos

### 13.1 Sujeitos experimentais

Para fazer os experimentos-piloto de inibição cortical com optogenética em malha fechada, foram utilizados 2 ratos Wistar machos adultos (identificações R22 e R23). Ambos já haviam passado pelo teste de memória espacial no labirinto de Barnes e, naquela ocasião, fizeram parte do grupo controle. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do LANECS sob um ciclo claro/escuro com alternância a cada 12 horas (início do ciclo claro às 7h), além de receberem água e ração balanceada *ad libitum* durante todo o período de permanência no biotério. As condições em que foram acomodados e mantidos (características da caixa, temperatura do ambiente e *handling*) são as mesmas descritas na seção 8.1 da Parte II.

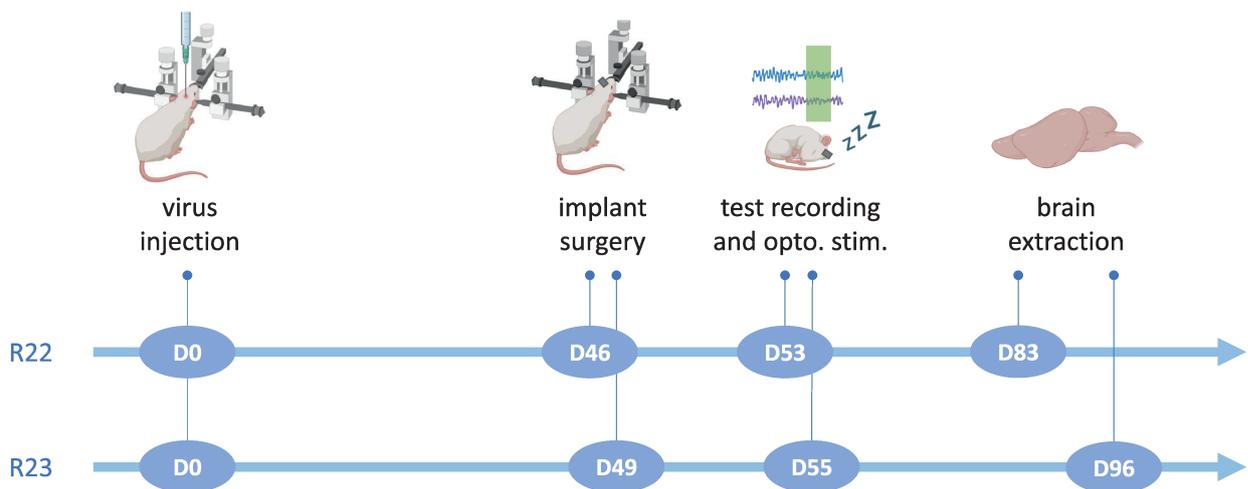
### 13.2 Protocolo experimental

As etapas do protocolo experimental ao qual os animais foram submetidos estão ilustradas na Figura 32. Os animais R22 e R23 foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão do vetor viral no mesmo dia (D0, 9 de fevereiro de 2024) e pesavam 380 g e 410 g, respectivamente. Em seguida, passaram por uma nova cirurgia estereotáxica para implante da fibra óptica e dos eletrodos de registro nos dias D46 (R22) e D49 (R23). Nos dias D53 (R22) e D55 (R23) foram realizados os registros de teste do sistema, que duraram cerca de 1h30 cada, e que incluíram o acionamento automático e em tempo real do estímulo luminoso para inibição cortical logo após a detecção de *ripples*. Já nos dias D83 e D96, respectivamente, os animais R22 e R23 foram eutanasiados e tiveram seus cérebros extraídos, fixados e conservados, conforme o protocolo descrito na seção 8.3 da Parte II.

### 13.3 Cirurgia estereotáxica

Os 2 animais de teste foram submetidos ao procedimento de cirurgia estereotáxica em dois momentos distintos com as seguintes finalidades: 1) infusão do vetor viral contendo os genes da opsina inibitória e 2) implantação da fibra óptica e dos eletrodos de registro eletrofisiológico.

Figura 32 – Protocolo experimental. Os animais R22 e R23 foram submetidos a duas cirurgias estereotáxicas em momentos distintos para, primeiro, injetar o vetor viral no mPFC e, depois, realizar o implante intracraniano da fibra óptica e dos eletrodos. Cerca de 1 semana depois foram realizados os registros de teste do sistema com detecção de *ripples* em tempo real seguida da ativação do estímulo luminoso para inibir os neurônios do mPFC. A última etapa foi a de extração dos encéfalos para, posteriormente, verificar a expressão da opsina no córtex.



Fonte: elaborada pelo autor com imagens de [biorender.com](https://www.biorender.com).

### 13.3.1 Cirurgia para infusão do vetor viral

Os procedimentos iniciais da cirurgia para infusão do vetor viral foram idênticos aos da cirurgia para implante de eletrodos descrita na seção 8.2 da Parte II. Em resumo, após a indução anestésica com cetamina e xilazina, foram realizadas a fixação da cabeça do animal no aparelho estereotáxico, a incisão próxima da linha medial do crânio, a remoção de tecido conjuntivo e o nivelamento do crânio.

Especificamente em relação a essa cirurgia, foi realizada apenas uma craniotomia para a infusão unilateral do vetor viral na região pré-límbica do mPFC, nas coordenadas AP = +3,0, ML = -0,5, DV = -3,5 mm relativas ao Bregma. Foi injetado 1  $\mu\text{L}$  do constructo AAV5-CamKII-ArchT-GFP ( $\geq 7 \times 10^{12}$  vg/mL; AddGene) a uma taxa de 0,1  $\mu\text{L}/\text{min}$  por meio de uma micropipeta de vidro acoplada a uma bomba de infusão automática (MICRO2T, World Precision Instruments). Antes da infusão do vetor viral, a extremidade da micropipeta foi inserida até 0,1 mm abaixo do alvo (DV = -3,6 mm) e mantida por 30 s para a criação de uma cavidade de acomodação da solução viral. Após o retorno da micropipeta para a coordenada-alvo e a infusão do constructo viral, a micropipeta foi mantida imóvel por 8 minutos para permitir a difusão da solução antes de ser lentamente removida. Ao término da cirurgia, a pele sobre o crânio do animal foi suturada e foram aplicadas solução salina por via subcutânea, pentabiótico por via intramuscular e anti-inflamatório por via subcutânea, de forma idêntica à descrita na seção 8.2.2 da Parte

## II.

### 13.3.2 Cirurgia para implante da fibra óptica e dos eletrodos de registro

A cirurgia de implante da fibra óptica e dos eletrodos seguiu os mesmos passos descritos na seção 8.2 da Parte II, com exceção da quantidade de craniotomias realizadas e do tipo de elemento de transdução/atuação inserido. Como ilustrado na Figura 33A, as craniotomias feitas nesta cirurgia tiveram como alvos a região pré-límbica do mPFC (AP = +3,0, ML = -0,5, DV = -3,5 mm), para inserção do conjunto fibra-eletrodo, e a região de CA1 do hipocampo (AP = -5,4, ML = -4,6, DV = -2,3 mm), para colocação de um estereotrodo de tungstênio do tipo par trançado (fios individuais com diâmetro de 76,2  $\mu\text{m}$  sem revestimento e 114,3  $\mu\text{m}$  com revestimento; distância de 500  $\mu\text{m}$  entre eles; A-M Systems, EUA). Foram feitas outras 5 craniotomias para fixação de parafusos no crânio, sendo 2 no osso occipital, para aterramento e referência, e 3 nos ossos parietal, para suporte da estrutura do conector. O conjunto fibra-eletrodo inserido no mPFC é composto por uma fibra óptica de 300  $\mu\text{m}$  acoplada a um estereotrodo de tungstênio semelhante ao inserido em CA1 (fios individuais com diâmetro de 50,8  $\mu\text{m}$  sem revestimento e 101,6  $\mu\text{m}$  com revestimento). O eletrodo foi acoplado à fibra de modo que um dos canais foi posicionado acima da extremidade da fibra e o outro abaixo (ver Figura 35B). Adicionalmente, um eletrodo para registro de EMG foi colocado sobre o músculo nucal do animal.

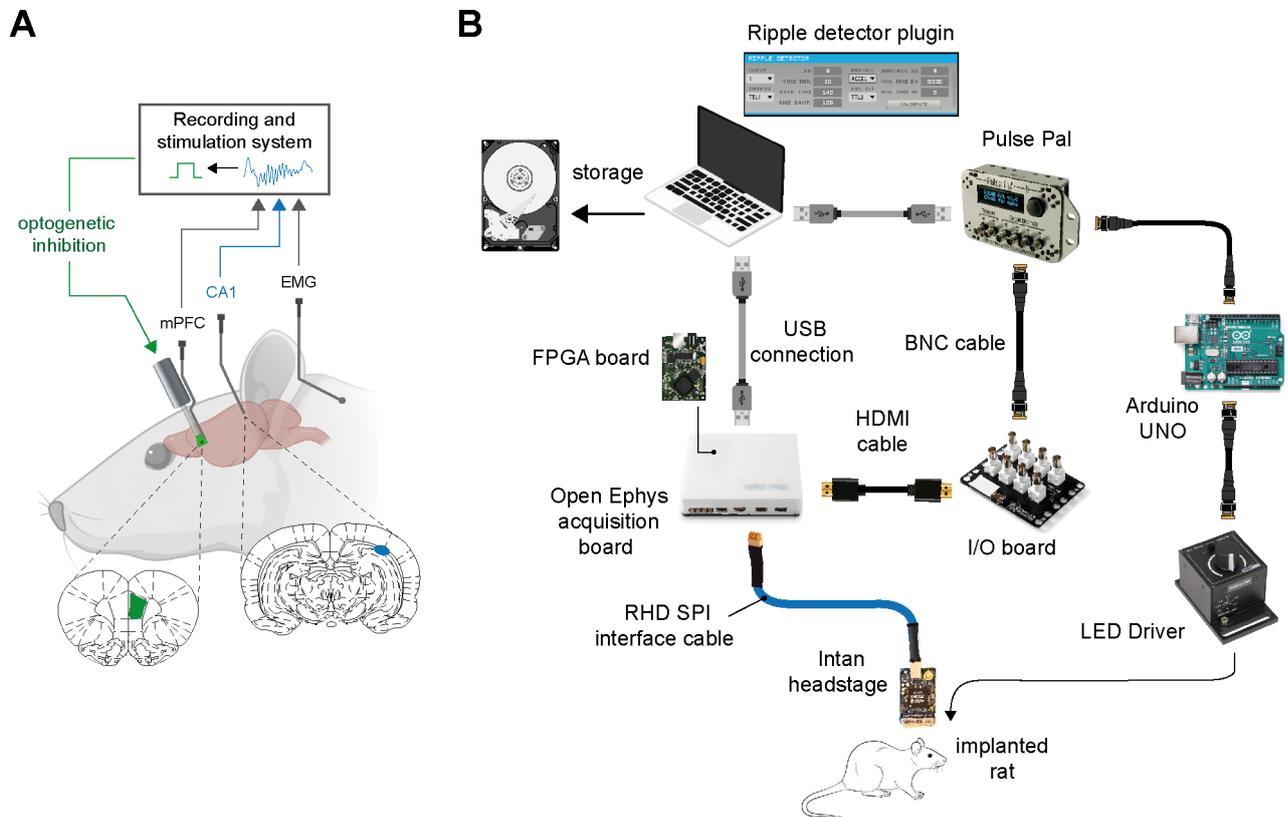
### 13.4 Arquitetura de *hardware* e *software*

Os componentes de *hardware* e *software* que constituem o sistema de manipulação optogenética em malha fechada são, em grande parte, os mesmos utilizados na Parte II deste trabalho para a perturbação de *ripples*. A diferença se dá na porção final da malha, em que o estimulador e o isolador óptico foram substituídos por um Arduino UNO e um *driver* de LED (T-Cube, Thorlabs; Figura 33B). O Arduino recebe o comando do Pulse Pal via entrada de interrupção e dispara um pulso monofásico na entrada do *driver*, ajustado para gerar a corrente nominal de alimentação do LED acoplado à fibra óptica do implante. A presença do Arduino no sistema permite a introdução de um atraso variável e controlado entre o comando do Pulse Pal e a aplicação do estímulo optogenético. Essa funcionalidade será de grande importância em experimentos futuros que busquem isolar os efeitos da inibição em si, aplicando-a após as *ripples* mas em janelas de tempo posteriores à ocorrência dos eventos corticais delta e *spindle*.

### 13.5 Imageamento de fluorescência

Antes de realizar o imageamento de fluorescência para verificar a expressão de ArchT, os encéfalos dos animais R22 e R23 foram extraídos após perfusão intracardíaca

Figura 33 – Sistema para registro e manipulação optogenética em malha fechada. (A) Figura ilustrativa do posicionamento dos eletrodos de registro (mPFC, CA1 e EMG) e da fibra óptica (mPFC). A detecção de *ripples* em CA1 dispara um comando para a inibição optogenética no mPFC. (B) Elementos de *hardware* e *software* que compõem o sistema em malha fechada.



Fonte: elaborada pelo autor com imagens de diversas fontes: [https://stock.adobe.com/search?k=rat+drawing&asset\\_id=180482892](https://stock.adobe.com/search?k=rat+drawing&asset_id=180482892); [open-ephys.org](https://open-ephys.org/); [www.a-msystems.com/t-grass\\_stimulators.aspx](https://www.a-msystems.com/t-grass_stimulators.aspx); [intantech.com](https://intantech.com/); [biorender.com](https://biorender.com/).

de solução de PFA, fixados e conservados de maneira idêntica à descrita na seção 8.3 da Parte II. Os encéfalos foram então seccionados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em fatias de  $50\text{ }\mu\text{m}$  de espessura no criostato do Núcleo de Neurociências ICB/UFMG. Em seguida, as fatias foram transferidas para lâminas previamente gelatinizadas e sobre elas foi aplicada uma solução de DAPI (diluição 1:25000) para marcação dos núcleos dos neurônios. Após 10 minutos de contato da solução de DAPI com as fatias, as lâminas foram lavadas por imersão em PBS (2x, 5 minutos cada) antes de serem fechadas e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As lâminas já prontas foram levadas ao CAPI (ICB/UFMG) para a realização do imageamento de fluorescência com um microscópio confocal LSM 880 da ZEISS. As imagens objetivaram a identificação das marcações de DAPI e de GFP. Porém, uma avaliação inicial das imagens revelou que não houve marcação adequada com DAPI e, por isso, apenas as imagens de GFP foram consideradas nas análises.

## 14 III: Resultados e análises

### 14.1 Construção do implante para registro eletrofisiológico e manipulação optogenética

#### 14.1.1 Materiais e custos

Os materiais e equipamentos necessários para a construção do implante de fibra óptica (sem os eletrodos de tungstênio para registro), assim como os respectivos custos aproximados e os endereços eletrônicos dos *websites* de fornecedores, estão indicados nas Tabelas 11 e 12. Enquanto o preço de um modelo comercial semelhante<sup>1</sup> fica próximo de R\$ 830,76 reais (150,00 USD, cotação de 23 de setembro de 2024, transporte e impostos não inclusos), cada unidade do implante descrito neste trabalho custa cerca de R\$ 75,52 (Tabela 11). Esse custo unitário desconsidera os montantes despendidos com a aquisição de equipamentos para a preparação das fibras e para a medição da potência luminosa, que somam por volta de R\$ 19.477,59, mas que já estavam disponíveis no LANEC ou em laboratórios parceiros. Ainda assim, as despesas com a aquisição dos equipamentos são compensadas caso sejam produzidas mais do que 24 unidades do implante.

Tabela 11 – Materiais de consumo e equipamentos necessários para a construção do implante de fibra óptica. Preços obtidos no dia 22/09/2024. Unid. = unidade.

ID	Material/Equip.	Referência	Preço (R\$)	Preço Unid. (R\$)
1	Fibra óptica 300 $\mu\text{m}$ (10 m)	FT300UMT	26,03	0,52
2	Ferrule para fibra de 300 $\mu\text{m}$ (10)	CF340-10	689,37	68,94
3	Adesivo óptico UV	NOA81	447,70	4,48
4	Led SMD verde (100)	2835 Verde K2488	63,31	0,63
5	Adesivo opaco	UNO Preto	77,32	0,77
6	Fio 28 AWG (100 m)	-	62,03	0,06
7	Estanho para solda	-	12,28	0,12
				Total (unid.): 75,52
8	Medidor de potência luminosa	PM120VA	17.699,77	-
9	Desencapador de fibra	T16S31	872,19	-
10	Ponteira p/ clivagem de fibra	S90C	905,63	-
			Total: 19.477,59	

Fonte: elaborada pelo autor.

<sup>1</sup> Doric Lenses; *Single LED+Fiberoptic Cannula*, LFC\_525\_400/430-0.66\_6mm

Tabela 12 – Endereços eletrônicos dos *websites* de fornecedores dos componentes para a construção do implante de fibra óptica.

ID	Link
1	<a href="https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=FT300UMT">https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=FT300UMT</a>
2	<a href="https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=CF340-10">https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=CF340-10</a>
3	<a href="https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=NOA81">https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=NOA81</a>
4	<a href="https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-1193868276-100-pecas-led-alto-brilho-led-05w-3v-2835-verde-k2488-_JM">https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-1193868276-100-pecas-led-alto-brilho-led-05w-3v-2835-verde-k2488-_JM</a>
5	<a href="https://www.crifix.com.br/shopping/cola/pegatanke-epoxi-supercola-alta-temperatura-preta-branco">https://www.crifix.com.br/shopping/cola/pegatanke-epoxi-supercola-alta-temperatura-preta-branco</a>
6	<a href="https://www.malhadep prata.com.br/cabos-rolos/cabinho-flexivel-estanhado-0-10mm-tiaflex-rola-100m">https://www.malhadep prata.com.br/cabos-rolos/cabinho-flexivel-estanhado-0-10mm-tiaflex-rola-100m</a>
7	<a href="https://www.usinainfo.com.br/estanho-para-solda/estanho-para-solda-fio-10mm-6337-22g-cobix-8293.html">https://www.usinainfo.com.br/estanho-para-solda/estanho-para-solda-fio-10mm-6337-22g-cobix-8293.html</a>
8	<a href="https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=PM120VA">https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=PM120VA</a>
9	<a href="https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=T16S31">https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=T16S31</a>
10	<a href="https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=S90C">https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=S90C</a>

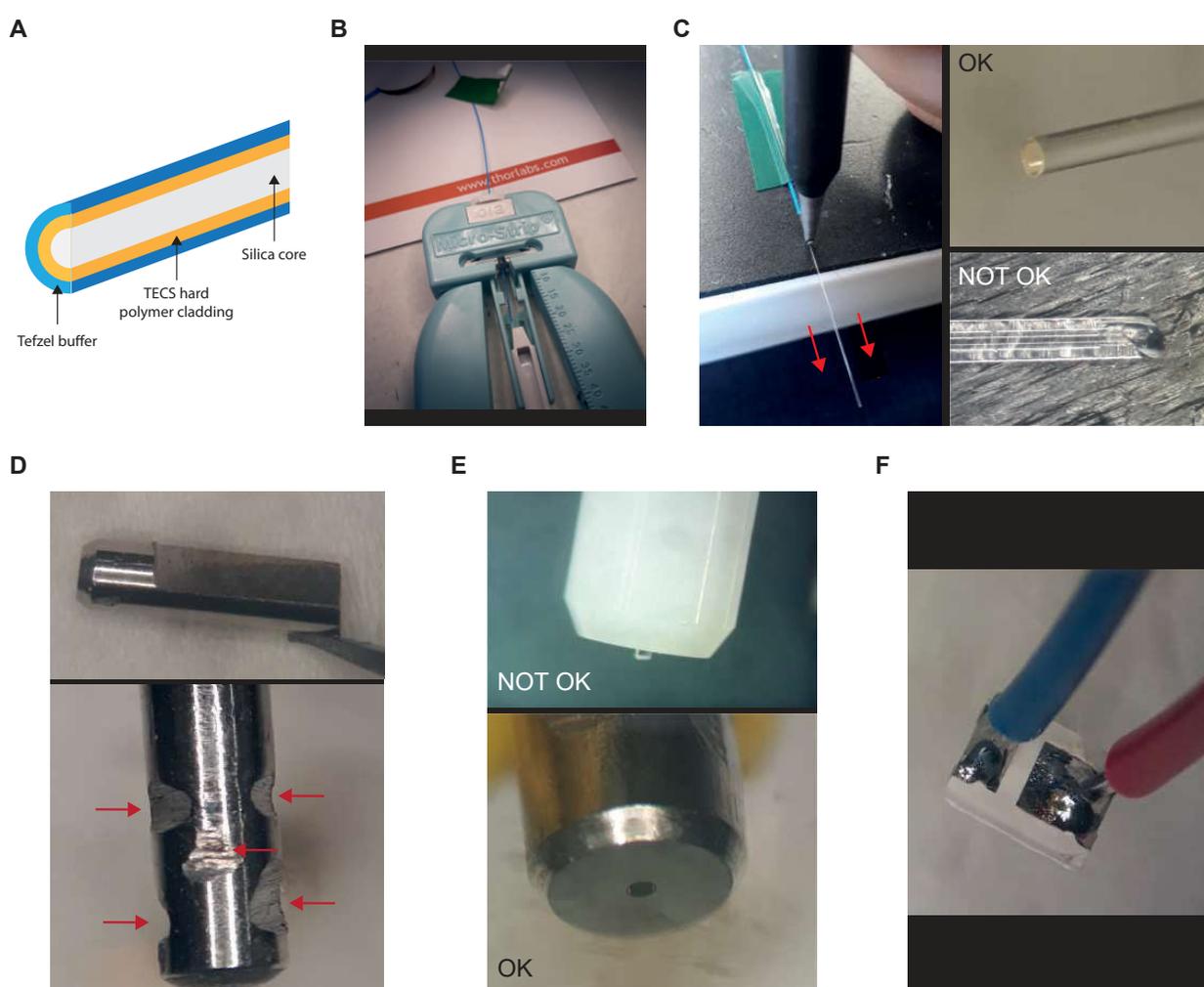
Fonte: elaborada pelo autor.

### 14.1.2 Preparação da fibra óptica

A fibra óptica é formada por 1) um núcleo de sílica altamente transparente, por onde a luz é conduzida, 2) uma casca com índice de refração ligeiramente inferior ao do núcleo, que o reveste e impede o escape da luz, e 3) uma capa polimérica protetora (Figura 34A). A fibra usada neste trabalho foi a FT300UMT (Thorlabs; multimodo, diâmetro do núcleo =  $300 \pm 6 \mu\text{m}$ , diâmetro com casca =  $325 \pm 10 \mu\text{m}$ , abertura numérica = 0,39). O primeiro passo consiste em remover a capa protetora azul da fibra com uma ferramenta desencapadora (Figura 34B). É importante que as dimensões da ferramenta sejam adequadas ao diâmetro da fibra para evitar danos à casca. Por exemplo, fibras com o diâmetro maior que o da ferramenta desencapadora podem sofrer arranhões na casca que prejudicarão a condução eficiente da luz.

O processo seguinte é um dos mais importantes: trata-se da clivagem da fibra, que consiste em “cortá-la” em um segmento mais curto, de modo que a extremidade cortada da fibra apresente uma superfície totalmente plana, sem irregularidades nem fragmentos de sílica, e perpendicular ao eixo do comprimento da fibra (Figura 34C). Para isso, a fibra desencapada é afixada em uma superfície sólida e plana (de vidro ou metal, por exemplo) por meio de uma fita adesiva. Enquanto a fibra é puxada, faz-se necessário aplicar uma leve pressão com a caneta de clivagem até que a fibra se parta. Se a pressão aplicada for maior que a ideal, a fibra será quebrada em vez de clivada e a superfície resultante apresentará irregularidades que diminuirão a qualidade de condução da luz. Esse processo de clivagem pode ser feito tanto manualmente, conforme descrito neste parágrafo, quanto por meio de equipamentos automáticos próprios para esse fim. Em todos os casos, o uso de óculos de proteção é indispensável durante toda esta etapa. As extremidades das fibras clivadas podem ser inspecionadas por meio de uma lupa.

Figura 34 – Preparação dos componentes para a construção do implante de registro eletrofisiológico e manipulação optogenética. **(A)** Composição da fibra óptica. O núcleo transparente de sílica é envolto por uma casca de sílica modificada (TECS, *Technology Enhanced Clad Silica*; Thorlabs) com índice de refração ligeiramente menor. Todo o conjunto é protegido por uma capa polimérica azul. **(B)** Ferramenta desencapadora de fibra. **(C)** Clivagem da fibra à esquerda e alguns possíveis resultados na coluna da direita. A superfície da extremidade da fibra deve ser plana, transparente, perpendicular ao eixo do comprimento da fibra e sem irregularidades. **(D)** Ferrule desbastado (em cima) e com ranhuras que facilitam a adesão e fixação da resina acrílica (embaixo). As setas vermelhas indicam os locais dos entalhes. **(E)** Inserção da fibra no ferrule. Ao final, a ponta da fibra deve estar totalmente alinhada com a superfície do ferrule. **(F)** Resultado da soldagem dos fios de alimentação no LED.



Fonte: **(A)** adaptada de [thorlabs.com](http://thorlabs.com); **(B-F)** elaborada pelo autor.

Usualmente, na construção de implantes intracranianos com fibra óptica, apenas uma das extremidades da fibra é clivada. Essa extremidade é inserida no cérebro do animal, enquanto que a outra é acoplada ao ferrule e polida com filmes abrasivos de grãos sucessivamente mais finos (por exemplo, 5  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  e 0,3  $\mu\text{m}$ ). A extremidade polida é então conectada à fonte de luz por meio de um cabo de fibra óptica. Entretanto,

no caso do implante abordado neste trabalho, em que o LED é acoplado diretamente sobre a superfície do ferrule, é desejável que a fibra seja capaz de captar e conduzir a maior quantidade possível de fótons. As restrições de tamanho, dissipação de calor e potência do LED impostas pela própria estrutura do implante demandam um aproveitamento máximo da luz gerada por ele, e mesmo uma extremidade de fibra bem polida pode ser menos eficiente se comparada a uma ponta clivada. Portanto, para este implante, ambas as extremidades da fibra foram clivadas. O comprimento final aproximado da fibra foi calculado por:

$$C = DV + 1 \text{ (espessura do crânio)} + 2 \text{ (espaço para resina acrílica)} + FL,$$

em que  $C$  é o comprimento da fibra,  $DV$  é a coordenada no eixo dorso-ventral da região-alvo e  $FL$  é o comprimento do ferrule, totalizando 17 mm.

### 14.1.3 Preparação do ferrule

Neste trabalho foram utilizados ferrules inteiros de cerâmica do modelo CF340-10 (Thorlabs; diâmetro do furo = 340  $\mu\text{m}$ , diâmetro do ferrule = 2,5 mm, comprimento = 10,5 mm). É desejável, quando possível, que o excesso de material do ferrule seja removido antes da inserção da fibra e da fixação do LED, tornando-o mais leve, curto e menos espesso. Isso resultará na economia de espaço na superfície do crânio e na redução do peso final do implante. O desbaste e o corte de ferrules de aço inoxidável podem ser realizados com uma micro retífica e recomenda-se que, ao final do processo, pequenas ranhuras sejam feitas na superfície lateral do ferrule para que a adesão da resina acrílica e a fixação do ferrule no crânio sejam reforçadas (Figura 34D). No caso de ferrules de cerâmica, a remoção de material e a confecção de ranhuras são mais difíceis e devem ser feitas com ferramentas de ponta diamantada.

### 14.1.4 Inserção da fibra no ferrule

O passo seguinte consiste na inserção da fibra no ferrule. Ela é feita pela extremidade do ferrule que possui o furo de maior diâmetro. É importante que a fibra seja encaixada com cuidado para que não haja danos nas extremidades já clivadas. Após a inserção dos primeiros milímetros de fibra, uma pequena quantidade de epóxi é colocada na entrada do ferrule, em contato com a fibra, para que o segmento restante a ser inserido possa aderir internamente ao canal do ferrule. Ao término da inserção, a extremidade da fibra que atingiu o lado oposto do ferrule (o que estará em contato com o LED) é ajustada para ficar no mesmo nível que a superfície do ferrule (Figura 34E).

Se um instrumento de inspeção de fibra óptica estiver disponível, é possível usá-lo para verificar a superfície da fibra após o tempo de secagem do epóxi. Ela deve possuir um formato arredondado e uma superfície limpa e transparente, sem nenhum tipo de irregula-

ridade ou material que possa prejudicar a condução da luz. A luz emitida pelo instrumento de inspeção e que sai pela outra extremidade da fibra deve apresentar uma área circular bem definida. Essa inspeção preliminar do formato da luz de saída fornece uma ideia da qualidade da clivagem e, caso se constate que a área é irregular, é recomendável descartar o conjunto fibra-ferrule em questão.

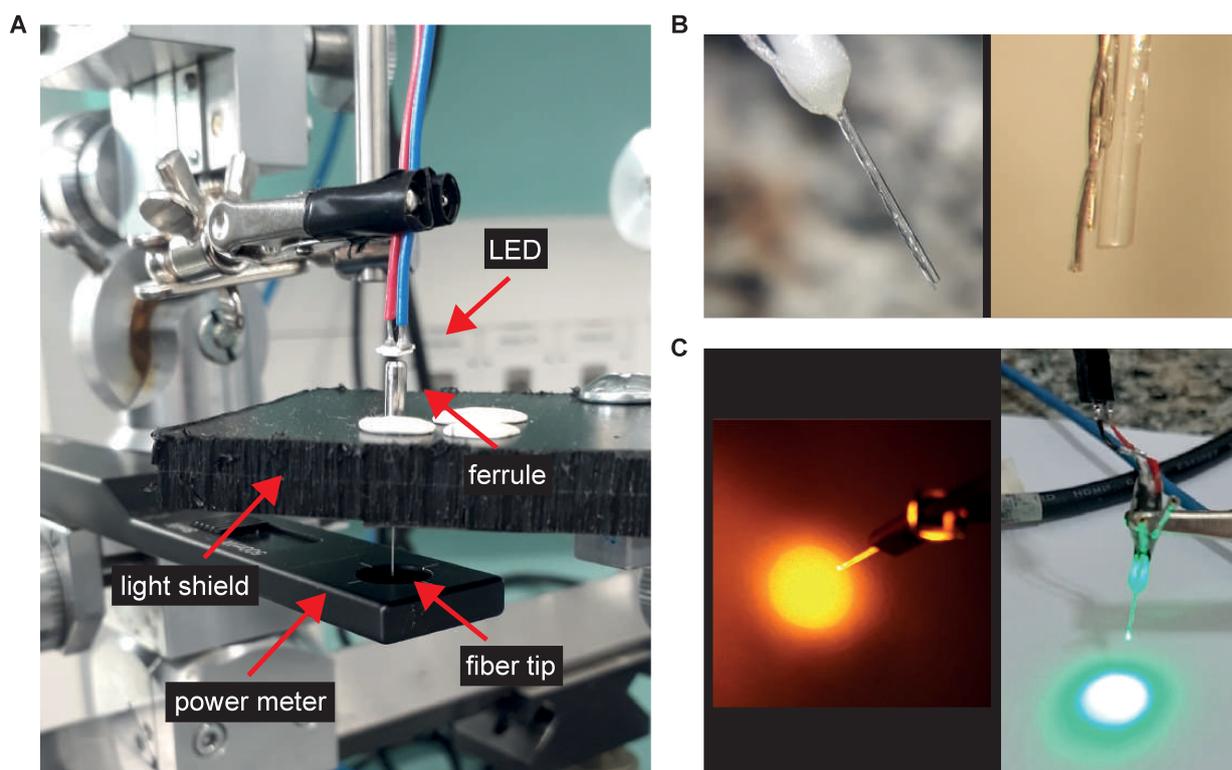
### 14.1.5 Preparação e posicionamento do LED

Com a fibra já inserida no ferrule, a próxima etapa é a de posicionamento e fixação do LED na superfície do ferrule. O modelo utilizado é o LED 2835 verde K2488 (0,5 W de potência, 150 mA de alimentação, comprimento de onda de 520-530 nm, fluxo luminoso de 40-45 lm, dimensões: 2,8 x 3,5 mm), cuja fonte de emissão de luz é concentrada em um pequeno ponto. Antes disso, é necessário soldar nos terminais do LED os dois fios de alimentação (Figura 34F). É recomendado que os fios sejam soldados verticalmente para economizar espaço nas laterais do implante. Na outra extremidade dos fios devem ser soldados os conectores que se encaixarão no cabo de alimentação do LED.

Depois que os fios de alimentação são soldados, o LED é então posicionado sobre a superfície do ferrule. O objetivo é encontrar a posição que maximiza a potência da luz na saída da ponta da fibra, para então fixá-lo no ferrule com epóxi opticamente transparente. Para esta etapa, são necessários um aparelho estereotáxico, um *driver* de LED, um medidor de potência luminosa e um amperímetro. O *driver* é usado para ligar o LED e o amperímetro para medir a corrente elétrica que passa por ele. A corrente fornecida pelo *driver* deve ser ajustada de modo que não seja nem muito alta, evitando a queima do LED e a geração excessiva de calor, nem muito baixa, para que não comprometa a faixa de medição de potência no momento do posicionamento do LED. O valor utilizado neste trabalho foi de cerca de 70% da corrente nominal do LED (~100 mA).

O conjunto fibra-ferrule deve ser preso a alguma estrutura que o mantenha imóvel e estável (Figura 35A). Além disso, a extremidade da fibra que será inserida no cérebro do animal deve ser posicionada logo acima da superfície sensível do sensor de potência luminosa. É desejável a instalação de um anteparo que impeça que a luz emitida pelo LED alcance o sensor de potência por outro meio que não seja a fibra óptica. Em seguida, o LED deve ser preso ao braço do aparelho estereotáxico e posicionado bem próximo da superfície do ferrule, quase a tocando. Com o LED e o medidor de potência luminosa ligados, as coordenadas da posição do LED nos eixos ML e AP devem ser ajustadas até que a potência máxima seja obtida. Uma vez encontrada, o LED deve ser erguido (movimento no eixo DV) para a colocação de uma pequena quantidade de epóxi opticamente transparente na superfície do ferrule. Por fim, o LED é baixado novamente até tocar levemente no epóxi e na superfície do ferrule, mantendo-se nas mesmas coordenadas nos eixos AP e ML. O epóxi deve então ser curado (recomenda-se o epóxi de cura rápida por luz ultravioleta)

Figura 35 – Posicionamento do LED sobre o ferrule e resultado final do implante. (A) Estrutura montada para posicionamento do LED. O medidor de potência deve ficar logo abaixo da extremidade da fibra que é inserida no cérebro do animal. O anteparo colocado entre o LED e o medidor evita que o escape de luz por fora da fibra interfira na medição. O conjunto fibra-ferrule deve estar bem preso ao aparato, de modo que apenas o LED se mova enquanto a posição de máxima potência é encontrada. (B) Fixação do eletrodo de registro na fibra. (C) Resultado final do implante. A luz de saída deve apresentar um formato circular e uniforme. A imagem à direita é a do implante utilizado no animal R22.



Fonte: elaborada pelo autor.

e o formato da luz de saída deve ser arredondado, como explicado na seção anterior. A potência luminosa final na saída da fibra ficou próxima de 1,5 mW.

#### 14.1.6 Fixação do eletrodo na fibra óptica

A fixação dos eletrodos de registro na fibra óptica pode ser feita com epóxi de cura por luz UV e reforçada por resina acrílica na base do ferrule (Figura 35B). Neste trabalho, foi acoplado à fibra um estereotrodo com uma diferença de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  entre as pontas dos eletrodos individuais de tungstênio (fios individuais com diâmetro de 50,8  $\mu\text{m}$  sem revestimento e 101,6  $\mu\text{m}$  com revestimento; A-M Systems, EUA), de modo que uma delas foi posicionada acima do plano de emissão de luz pela fibra e a outra abaixo desse mesmo plano (Figura 35B).

### 14.1.7 Finalização do implante com epóxi opaco

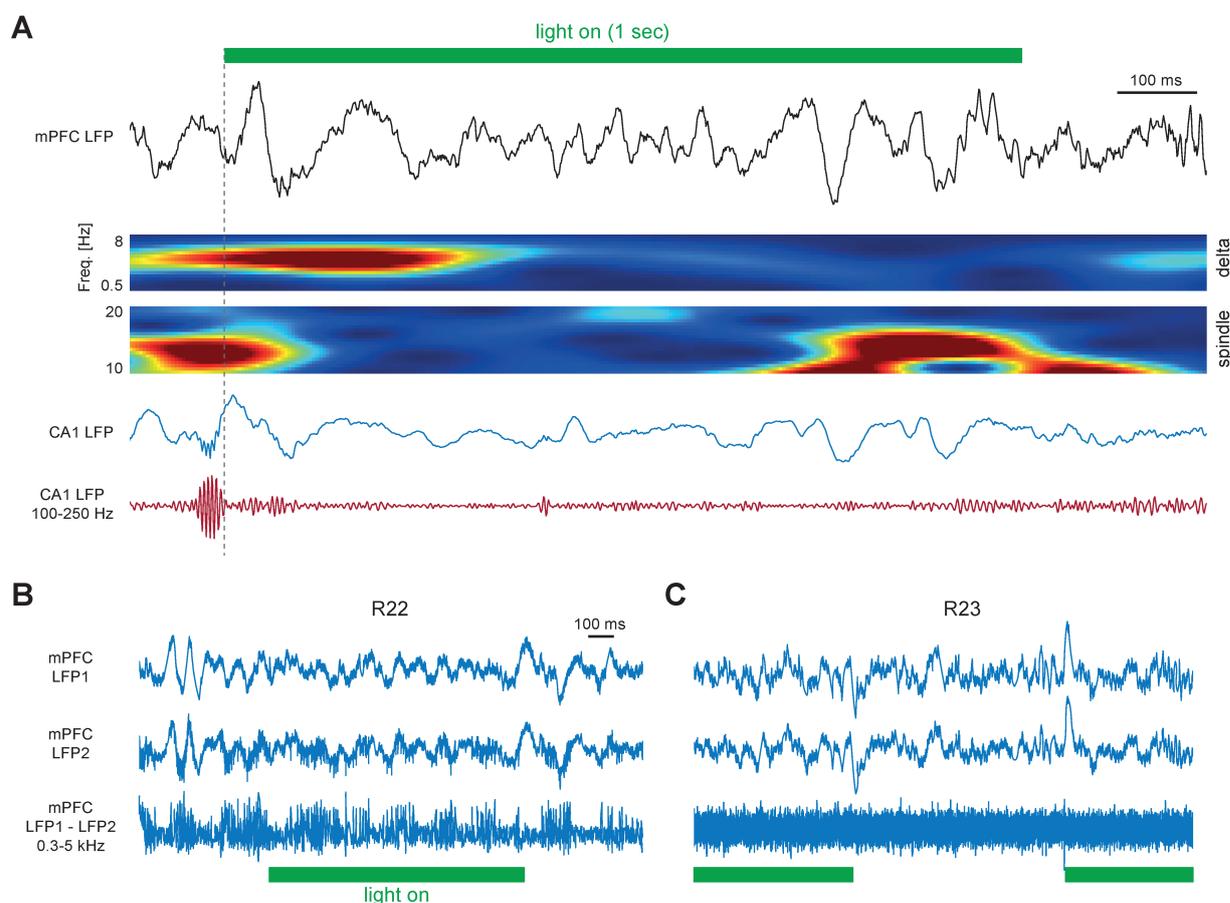
Por fim, a etapa de finalização do implante consiste em revestir o LED com um epóxi opaco. Isso evita que o vazamento de luz do LED favoreça o despertar do animal durante o registro de sono ou sirva como estímulo interferente nos experimentos comportamentais, desviando o foco atencional do animal durante a tarefa ou prejudicando outros aspectos do experimento. A quantidade de epóxi aplicada deve ser a mínima suficiente para bloquear o escape de luz. O excesso de deposição de epóxi resulta em um aumento do volume do implante, reduzindo a área sobre o crânio disponível para o implante de outras fibras e eletrodos, por exemplo.

## 14.2 Experimentos preliminares de inibição cortical em malha fechada

Ainda que a maior parte dos componentes do sistema de registro e manipulação optogenética em malha fechada seja a mesma utilizada na Parte II, a substituição de alguns equipamentos justifica a realização de uma nova verificação antes de se prosseguir com os experimentos principais. Para realizar a validação do sistema, dois animais transfectados com genes de ArchT no mPFC e implantados com fibra óptica na mesma região foram registrados por cerca de 1h (animais R22 e R23; eletrodos de registro no mPFC e em CA1). A opsina ArchT é uma bomba de prótons sensível à luz e apresenta condução máxima de prótons para fora da célula quando o comprimento de onda do estímulo luminoso está entre 550 e 600 nm (HAN et al., 2011). Durante o período de registro, um estímulo óptico com duração de 1 s era aplicado automaticamente assim que uma *ripple* era detectada. A Figura 36A apresenta um exemplo de registro que inclui um trecho de aplicação do estímulo luminoso após um evento de *ripple*.

Pela Figura 36A é possível constatar que o feixe de luz foi aplicado imediatamente após a *ripple*, atestando que a inclusão do Arduino e do *driver* de LED no sistema não resultou em um atraso capaz de comprometer o tempo de atuação sobre os eventos corticais subsequentes. Esse resultado já era esperado, tendo em vista que o tempo para processamento do comando de interrupção no Arduino é da ordem de centenas de nanossegundos (processador Atmel ATmega328, clock de 16 MHz) (ATMEL, 2015) e o tempo de acionamento do *driver* de LED é de algumas dezenas de microssegundos (THORLABS, 2023). Ainda na mesma figura, os espectrogramas calculados sobre o LFP do mPFC indicam os momentos em que há maior potência na faixa de delta e de *spindles* (espectrogramas obtidos com base no sinal filtrado nas faixas de 0,1-6 Hz e 8-22 Hz, respectivamente). O aumento da potência nas respectivas bandas de frequência são apenas uma sugestão inicial da presença de eventos delta e *spindle* no registro em questão, que deve ser confirmada por análises complementares que levem em consideração os critérios descritos na

Figura 36 – Experimento-piloto de inibição optogenética em malha fechada. (A) Exemplo de detecção de *ripple* seguida do acionamento do estímulo luminoso, que é conduzido até o mPFC via fibra óptica intracraniana para inibição optogenética (animal R22). Os traçados do mPFC e de CA1 apresentados foram decimados até uma taxa de 1 kHz. Os espectrogramas de delta e *spindle* foram criados com base no LFP do mPFC filtrado nas faixas de 0,1-6 Hz e 8-22 Hz, respectivamente. A linha vertical tracejada indica o início da aplicação do estímulo luminoso. (B) Trechos de registro do mPFC nos animais R22 e (C) R23. Os canais LFP1 e LFP2 correspondem, respectivamente, aos eletrodos acima e abaixo da superfície da fibra. O sinal criado pela diferença entre LFP1 e LFP2 e filtrado na faixa de 300-5000 Hz, indicativo da MUA, é exibido abaixo do LFP2. Os instantes de aplicação do estímulo luminoso estão indicados pelas barras verdes.



Fonte: elaborada pelo autor.

literatura para a correta identificação desses eventos.

Dada a correta expressão da opsina inibitória pelos neurônios excitatórios do mPFC, uma importante verificação que deve ser feita para atestar o funcionamento da técnica de optogenética é a de redução da atividade neuronal durante a incidência da luz. Uma das formas de se prosseguir com essa verificação é por meio da análise da atividade multiunitária (MUA; do inglês, *multiunit activity*). O registro de MUA contém assinaturas extracelulares dos potenciais de ação individuais de neurônios próximos do eletrodo

de registro. Nos registros realizados, não foi possível verificar visualmente uma redução da MUA durante a incidência da luz (Figuras 36B e C). A princípio, não houve queda na taxa de disparos detectados no animal R22 e, em relação ao animal R23, uma aparente relação sinal-ruído baixa parece ter impedido a detecção global de potenciais de ação, dificultando a avaliação dos efeitos do estímulo luminoso sobre a atividade unitária. No entanto, são necessárias análises quantitativas para confirmar ou refutar essas observações iniciais.

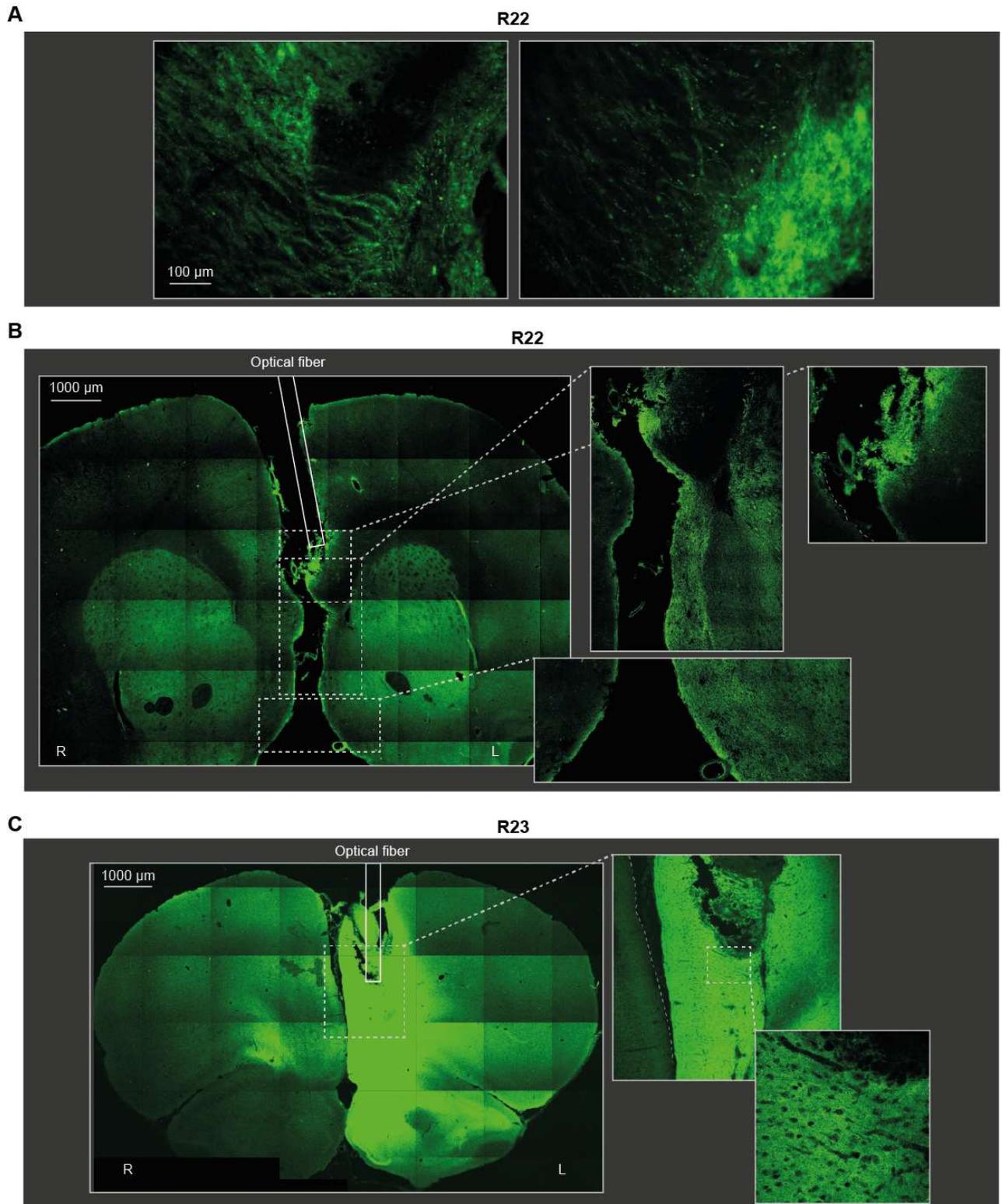
### 14.3 Expressão de ArchT

Uma das verificações necessárias para se prosseguir com os experimentos principais de manipulação optogenética em malha fechada é a de expressão da opsina inibitória nos neurônios do mPFC. Para isso, os encéfalos dos animais transfectados com o vírus foram fatiados e levados ao CAPI-ICB/UFMG para a produção de imagens de fluorescência. O constructo viral utilizado foi o AAV5-CamKII-ArchT-GFP, que já inclui o código para expressão de uma proteína fluorescente (GFP) acoplada à opsina.

A Figura 37A apresenta imagens de duas seções de fatias do cérebro do animal R22. É possível identificar diversas estruturas axonais e diferentes pontos de aglomeração da opsina, indicando a expressão de GFP e de ArchT. Tal expressão foi mais acentuada no hemisfério esquerdo, onde houve a transfecção do vírus e a implantação do conjunto fibra-eletrodo, como mostram as Figuras 37B e C. As lesões provocadas pela inserção da fibra e do eletrodo também são visíveis.

Pelas imagens da fatia do animal R22 (Figura 37B), nota-se que a expressão da opsina se concentrou em uma área próxima da região-alvo, onde a fibra óptica e o eletrodo foram inseridos, mas também se espalhou ao longo do eixo DV em direção à porção mais ventral, próximo do limite que divide os dois hemisférios. No caso do animal R23 (Figura 37C) parece ter havido uma superexpressão de ArchT, mas ainda preferencialmente no hemisfério-alvo. O que pode explicar esse excesso de expressão proteica e a diferença entre os dois animais são os respectivos intervalos entre a cirurgia de infusão do vetor viral e a extração dos encéfalos: para o animal R22, esse intervalo foi de 83 dias (09/02/2024 até 02/05/2024); no caso do animal R23, que apresentou superexpressão de ArchT, o intervalo foi de 96 dias (09/02/2024 até 15/05/2024). Nesse último caso, uma hipótese é a de que o prolongamento do intervalo pode ter favorecido o acúmulo de opsinas no tecido.

Figura 37 – Imagem de fluorescência (GFP) de fatias dos encéfalos dos animais R22 e R23 confirmando a expressão de ArchT. (A) Imagens de zoom da fatia do animal R22, evidenciando a expressão de ArchT ao longo de estruturas axonais e em pontos específicos, provavelmente próximo aos corpos celulares. (B) Fatias dos animais R22 e (C) R23, com destaque para o local de inserção do conjunto fibra-eletrodo. R: hemisfério direito; L: hemisfério esquerdo.



Fonte: elaborada pelo autor.

## 15 III: Discussão

De maneira geral, os resultados desta Parte III atestam a expressão de ArchT no mPFC, ainda que mais testes sejam necessários para ajustar e padronizar o nível de expressão. Além disso, foi verificado o funcionamento do sistema de manipulação optogenética em malha fechada, que é capaz de atuar em tempo hábil para interferir nas redes corticais após a detecção de *ripples* no hipocampo. Também está contemplada nesta parte uma descrição detalhada das etapas necessárias para a construção do implante de fibra óptica, que tem a particularidade de possuir a fonte emissora de luz acoplada ao próprio implante e, por isso, simplifica e facilita a estimulação optogenética em tarefas de grande locomoção do animal e por períodos prolongados. Esses resultados pavimentam o caminho para a execução de experimentos futuros no laboratório que busquem testar uma parte importante da hipótese condutora deste trabalho: a de que a perturbação cortical da comunicação hipocampo-córtex durante o sono gera prejuízo na consolidação de memória.

Um ponto que ainda deve ser verificado de forma mais criteriosa é a capacidade do estímulo luminoso de gerar a inibição dos neurônios do mPFC. Pelos testes preliminares com o registro de MUA do animal R22 (Figura 36B) e considerando que o sinal de fato apresenta potenciais de ação em sua composição, não há redução visível da taxa de disparos durante a incidência da luz, como foi observado, por exemplo, no trabalho de [Gilmartin et al. \(2013\)](#). Uma das razões possíveis seria a expressão reduzida da opsina no momento em que os registros foram realizados. Ainda que a expressão tenha sido confirmada pelas imagens de fluorescência, elas indicam a presença de opsina 30 dias após o teste de inibição, que foi quando houve a extração e fixação do encéfalo do animal R22. Portanto, o retrato da expressão fornecido pelas imagens de fluorescência pode não representar bem as condições presentes no instante do teste. Esses resultados, em conjunto com a aparente superexpressão da opsina no animal R23, indicam a necessidade de readequar o cronograma experimental de modo a considerar os intervalos ótimos entre a infusão do vetor viral, a execução dos experimentos de inibição e a extração dos encéfalos.

Outro fator que pode ter impedido a redução de disparos no mPFC é a potência do estímulo luminoso na extremidade da fibra, que pode ter ficado abaixo do que é suficiente para elicitar uma fotoinibição significativa. Nos implantes construídos neste trabalho, a potência medida foi de cerca de 1,5 mW (irradiância aproximada de 5,3 mW/mm<sup>2</sup> calculada em [web.stanford.edu/group/dllab/cgi-bin/graph/chart.php](http://web.stanford.edu/group/dllab/cgi-bin/graph/chart.php); [Aravanis et al. \(2007\)](#)). Em alguns artigos que fizeram o uso da mesma opsina e conseguiram uma redução na taxa de *spikes*, a potência medida variou consideravelmente: de 1 a 18 mW ([STEFANIK et al., 2013](#); [VEN et al., 2016](#); [BABL](#); [RUMMELL](#); [SIGURDSSON, 2019](#); [LAFFERTY](#);

BRITT, 2020; VOGEL et al., 2022; DHAWAN et al., 2023). Porém, no trabalho de Bahl, Rummell e Sigurdsson (2019), os pesquisadores testaram diferentes intensidades de estímulo luminoso (0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 16 mW na extremidade da fibra óptica) e reportam uma inibição de quase metade dos neurônios a partir de 1 mW, atingindo um nível quase assintótico de 50% de redução na taxa de disparos já em 2 mW. Também no trabalho de Jiang et al. (2017), os autores reportam inibição com 1 mW utilizando Arch, uma opsina menos sensível que sua sucessora ArchT.

Apesar da hipótese inicial de que o valor de potência luminosa utilizado neste trabalho tenha ficado abaixo do suficiente para gerar fotoinibição, alguns dos trabalhos citados anteriormente indicam que é possível inibir uma parcela relevante dos neurônios com potências a partir de 1mW. Mesmo assim, sabendo que o volume de tecido cerebral sob influência da luz e o alcance da inibição aumentam à medida que a potência também aumenta, uma sugestão para os implantes futuros é a utilização de LEDs de mais alta potência. Existem modelos disponíveis no mercado que possuem as mesmas dimensões do LED utilizado neste trabalho, mas que oferecem maior potência luminosa<sup>1</sup>. Outras características dos componentes do implante, tais como o comprimento de onda do estímulo luminoso (mais inserido no espectro amarelo/âmbar, próximo dos 590 nm) e as especificações da fibra óptica (dimensões e abertura numérica), também podem ser alteradas com a finalidade de se obter uma fotoinibição mais efetiva.

---

<sup>1</sup> LED 2835 verde K2686 (1W de potência, 300-350 mA de alimentação, comprimento de onda de 520-525 nm, fluxo luminoso de 70-80 lm, dimensões: 2,8 x 3,5 mm)

## 16 Conclusões gerais

A comunicação entre o hipocampo e redes neocorticais tem, sem dúvida, grande relevância na consolidação de memórias declarativas durante o sono. Nesse diálogo entre áreas, a participação das SWRs, assim como sua interação com eventos oscilatórios corticais, parece representar uma janela de oportunidade para que os processos de consolidação aconteçam. O que este trabalho mostra é que os mecanismos de consolidação mediados por SWRs atuam na formação de memória espacial do labirinto de Barnes. A interrupção de tais atividades oscilatórias durante o sono pós-aprendizado indica alterações na formação de memória remota, mas não recente. Mais especificamente, em comparação com o grupo controle, os animais submetidos à perturbação de *ripples* exploraram menos o quadrante-alvo (região do escape) apenas no teste realizado 12 dias após o fim da etapa de aprendizado (D16, na cronologia do protocolo experimental). Além disso, foram reveladas alterações na dinâmica de exploração do labirinto na sessão do dia D16 que indicam um possível prejuízo de memória. Este é o primeiro trabalho a mostrar que os efeitos da interrupção seletiva de *ripples* durante o sono são percebidos vários dias depois do período de aprendizado, mas não quando avaliados após 24 horas (D5).

Para realizar os experimentos que forneceram tais evidências, foi necessário construir uma infraestrutura de hardware e software para registro eletrofisiológico e estimulação em malha fechada. Uma importante parte dessa construção foi o desenvolvimento de um módulo de detecção de SWRs integrado à interface do sistema de aquisição Open Ephys. O *plugin* desenvolvido, por ser capaz de detectar SWRs em tempo hábil, viabilizou os experimentos de intervenção na atividade neural enquanto esses eventos oscilatórios ainda aconteciam. A publicação do *plugin* e sua posterior incorporação na interface nativa do Open Ephys representam um avanço no esforço de contribuir para a reprodutibilidade dos experimentos baseados na detecção online de SWRs. Por fim, os experimentos-piloto com optogenética abrem caminho para avaliar, em trabalhos futuros do laboratório, a relevância da interação entre SWRs, ondas delta e *spindles* na consolidação de memórias durante o sono.

## 17 Limitações do trabalho

As alterações comportamentais observadas na sessão do dia D16 no labirinto de Barnes parecem representar, de fato, um efeito do protocolo de perturbação de *ripples*. Entretanto, há que se ter cautela ao afirmar que houve um prejuízo inequívoco da memória remota em comparação com o grupo controle, especialmente quando é tomado como referência apenas o tempo despendido no quadrante-alvo. Mesmo que tenha havido diferença entre os grupos, o grupo controle não permaneceu mais do que 25% do tempo no quadrante-alvo, o que indica ausência de preferência pelo local do escape e de formação de memória. Em relação ao número de *head dips*, é difícil estabelecer um nível de acaso, mas não houve exploração preferencial das saídas do quadrante-alvo em relação aos demais, também apesar da diferença entre os grupos. O que parece revelar um resquício de memória no grupo controle é a dinâmica de exploração ao longo da sessão do dia D16: os animais começam por explorar preferencialmente as saídas do quadrante-alvo e, ao constatarem a inexistência do escape, ampliam a busca em outras seções do labirinto. Além disso, a permanência do tempo de exploração desse quadrante em 25% ao longo de toda a sessão pode indicar uma insistência em encontrar o escape, contrastando com o comportamento dos animais do grupo experimental. Ainda assim, outras métricas de desempenho na sessão de teste, tais como a estratégia utilizada até o encontro do antigo local do escape, o número de erros e a latência, podem contribuir para uma análise mais completa do comportamento do animal e ajudar na elucidação dos efeitos provocados pela interrupção das *ripples* na formação de memória.

Outro ponto diz respeito à etapa da formação de memória (aquisição, consolidação ou evocação) efetivamente prejudicada pela perturbação desses eventos. Conforme mostra o trabalho de [Norimoto et al. \(2018\)](#), a interrupção de *ripples* antes do aprendizado prejudica a renormalização dos pesos sinápticos e gera prejuízo na formação de memória, muito provavelmente por saturar as redes e impedir que a aquisição de novas informações ocorra eficientemente. Esses resultados estão alinhados com a SHY. No caso do presente trabalho, é difícil determinar se a interrupção prejudicou, de fato, a potenciação sináptica na via hipocampo-córtex e a consolidação durante o sono pós-aprendizado, ou a redução global das forças sinápticas e a aquisição/evocação no dia seguinte. Alterações no protocolo utilizado ou o emprego de outros testes comportamentais são necessários para identificar os efeitos da interrupção de *ripples* em cada uma dessas etapas isoladamente.

Por fim, e ainda em relação aos experimentos com o BM, as alterações comportamentais observadas no grupo experimental têm como referência um grupo controle não implantado e, portanto, não submetido à estimulação elétrica. Todos esses fatores – cirurgia, implante e estímulo elétrico – atuam como variáveis não controladas no desenho

experimental e podem contribuir para uma interpretação equivocada dos resultados. A realização de um grupo controle que também receba os estímulos na comissura, mas aplicados com um certo atraso após as SWRs, permitirá diferenciar o efeito da interrupção das *ripples*, durante as quais há o processo de *replay* neuronal, daquele que possa ser o do estímulo elétrico em si. Além disso, iguala os possíveis efeitos causados pelo implante e pelo procedimento de cirurgia estereotáxica.

## 18 Sugestões de trabalhos futuros

Mesmo que este trabalho forneça evidências importantes acerca dos mecanismos de consolidação de memória durante o sono, existe ainda muito espaço para tornar mais robustos os resultados encontrados. Nesse sentido, e conforme discutido na seção 10.4 da Parte II, uma das primeiras providências seria aumentar o tamanho amostral para reduzir a variabilidade e melhorar a confiabilidade dos testes estatísticos. Outro ponto importante, que também foi discutido na mesma seção, trata da inclusão de experimentos controle. Além do grupo com aplicação do estímulo fora do intervalo de ocorrência das *ripples*, dois outros importantes são o *sham*, composto por animais implantados que não recebem estímulo elétrico, e um grupo controle negativo de aprendizado espacial no BM. O grupo *sham* permitirá a caracterização eletrofisiológica do sono pós-aprendizado sem qualquer tipo de estímulo elétrico. Já o outro grupo seria exposto a variações do protocolo experimental em que a localização do escape não permaneceria constante entre as sessões. A ideia é avaliar o provável uso de estratégias alternativas que não se apoiem na memória espacial. Além disso, como apontado no trabalho de Beraldo (2024), a realização desse experimento se justifica, inclusive, pela possibilidade de distinguir as alterações eletrofisiológicas que são resultado do aprendizado espacial daquelas que emergem apenas pela simples exposição ao labirinto, em condições que não promovam o aprendizado.

Ainda com os dados coletados neste trabalho, diversas análises complementares podem ser feitas para melhor investigar a interação entre hipocampo e mPFC na consolidação da memória durante o sono. É válido lembrar que, apesar de não ter sido utilizado neste trabalho, o LFP do mPFC também foi registrado. As análises poderiam começar, por exemplo, pela caracterização da ocorrência de eventos delta e *spindle* no mPFC, tanto de forma isolada quanto em associação temporal com SWRs. Além disso, outras medidas de conectividade entre hipocampo e mPFC, tais como coerência espectral e causalidade de Granger, poderiam trazer mais pistas sobre o funcionamento e a relevância da relação entre essas áreas na consolidação durante o sono.

São vários os estudos que apontam a importância do sono REM para os processos de consolidação. Será que, de algum modo, as características oscilatórias dessa fase do sono foram afetadas com a interrupção das SWRs em NREM? Haveria algum mecanismo compensatório via oscilações teta, por exemplo, que estivesse correlacionado com o desempenho individual dos animais na tarefa? Análises complementares que busquem contribuir para a elucidação de questões desse tipo também podem ser realizadas a partir dos dados coletados neste trabalho.

Por fim, uma das principais frentes de continuidade deste trabalho são os experimentos de perturbação do mPFC durante eventos de delta e *spindle* sincronizados com as

SWRs hipocampais. Para isso, um dos requisitos é a validação da inibição optogenética com o implante descrito na Parte III. Se a sincronia entre *ripple*, delta e *spindle* representa, de fato, uma janela de oportunidade para a estabilização de representações de memória nas redes corticais, é esperado que a interferência seletiva e localizada em tais redes gere prejuízo na consolidação durante o sono.

## Referências

- ABEL, T.; LATTAL, K. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 11, n. 2, p. 180–187, abr. 2001. ISSN 09594388. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095943880000194X>>.
- ADAMANTIDIS, A. R.; HERRERA, C. G.; GENT, T. C. Oscillating circuitries in the sleeping brain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 20, n. 12, p. 746–762, dez. 2019. ISSN 1471-003X, 1471-0048. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41583-019-0223-4>>.
- ALEMAN-ZAPATA, A.; MORRIS, R. G. M.; GENZEL, L. Sleep deprivation and hippocampal ripple disruption after one-session learning eliminate memory expression the next day. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 119, n. 44, p. e2123424119, nov. 2022. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Number: 44. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/10.1073/pnas.2123424119>>.
- ALEMAN-ZAPATA, A.; MEIJ, J. V. D.; GENZEL, L. Disrupting ripples: Methods, results, and caveats in closed-loop approaches in rodents. *Journal of Sleep Research*, v. 31, n. 6, p. e13532, dez. 2022. ISSN 0962-1105, 1365-2869. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jsr.13532>>.
- ALHOLA, P.; POLO-KANTOLA, P. Sleep deprivation: Impact on cognitive performance. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, Dove Medical Press, v. 3, n. 5, p. 553–567, 2007. PMID: 19300585. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2147/ndt.s12160203>>.
- ALMEIDA-FILHO, D. G.; QUEIROZ, C. M.; RIBEIRO, S. Memory corticalization triggered by REM sleep: mechanisms of cellular and systems consolidation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 75, n. 20, p. 3715–3740, out. 2018. ISSN 1420-682X, 1420-9071. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-018-2886-9>>.
- ANDERSEN, P.; MORRIS, R.; AMARAL, D.; BLISS, T.; O'KEEFE, J. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, 2006. ISBN 9780195100273. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001>>.
- ANDRIANOVA, L.; YANAKIEVA, S.; MARGETTS-SMITH, G.; KOHLI, S.; BRADY, E. S.; AGGLETON, J. P.; CRAIG, M. T. No evidence from complementary data sources of a direct glutamatergic projection from the mouse anterior cingulate area to the hippocampal formation. *eLife*, eLife Sciences Publications, Ltd, v. 12, p. e77364, aug 2023. ISSN 2050-084X. Disponível em: <<https://doi.org/10.7554/eLife.77364>>.
- ARAVANIS, A. M.; WANG, L. P.; ZHANG, F.; MELTZER, L. A.; MOGRI, M. Z.; SCHNEIDER, M. B.; DEISSEROTH, K. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *Journal of neural engineering*, v. 4, n. 3, p. S143–S156, 2007.
- ATMEL. *Datasheet: 8-bit AVR Microcontroller with 32K Bytes In-System Programmable Flash*. 2015. Disponível em: <[https://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/Atmel-7810-Automotive-Microcontrollers-ATmega328P\\_Datasheet.pdf](https://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/Atmel-7810-Automotive-Microcontrollers-ATmega328P_Datasheet.pdf)>.

BABL, S. S.; RUMMELL, B. P.; SIGURDSSON, T. The Spatial Extent of Optogenetic Silencing in Transgenic Mice Expressing Channelrhodopsin in Inhibitory Interneurons. *Cell Reports*, v. 29, n. 5, p. 1381–1395.e4, out. 2019. ISSN 22111247. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124719312379>>.

BADDELEY, A. Working memory. *Current Biology*, v. 20, n. 4, p. R136–R140, 2010. ISSN 0960-9822. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982209021332>>.

BARNES, C. A. Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 93, n. 1, 1979.

BAUD, M. O.; MAGISTRETTI, P. J.; PETIT, J.-M. Sustained Sleep Fragmentation Induces Sleep Homeostasis in Mice. *Sleep*, v. 38, n. 4, p. 567–579, abr. 2015. ISSN 0161-8105, 1550-9109. Disponível em: <<https://academic.oup.com/sleep/article/38/4/567/2416902>>.

BENDOR, D.; WILSON, M. A. Biasing the content of hippocampal replay during sleep. *Nature Neuroscience*, v. 15, n. 10, p. 1439–1444, out. 2012. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn.3203>>.

BERALDO, I. J. S. *Validação e otimização de uma toolbox de código aberto para a classificação de estados do ciclo-sono vigília a partir de registros eletrofisiológicos hipocámpais e neocorticais*. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2021. Graduação em Ciências Biológicas.

BERALDO, I. J. S. *Explorando a corticalização das memórias: marcadores eletrofisiológicos da consolidação da memória na tarefa do Labirinto de Barnes*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2024. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia.

BINDER, S.; MÖLLE, M.; LIPPERT, M.; BRUDER, R.; AKSAMAZ, S.; OHL, F.; WIEGERT, J. S.; MARSHALL, L. Monosynaptic Hippocampal-Prefrontal Projections Contribute to Spatial Memory Consolidation in Mice. *The Journal of Neuroscience*, v. 39, n. 35, p. 6978–6991, ago. 2019. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Number: 35. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2158-18.2019>>.

BISAZ, R.; TRAVAGLIA, A.; ALBERINI, C. M. The Neurobiological Bases of Memory Formation: From Physiological Conditions to Psychopathology. *Psychopathology*, v. 47, n. 6, p. 347–356, 2014. ISSN 0254-4962, 1423-033X. Disponível em: <<https://karger.com/PSP/article/doi/10.1159/000363702>>.

BLACKWELL, T.; YAFFE, K.; LAFFAN, A.; ANCOLI-ISRAELI, S.; REDLINE, S.; ENSRUD, K. E. Associations of Objectively and Subjectively Measured Sleep Quality with Subsequent Cognitive Decline in Older Community-Dwelling Men: The MrOS Sleep Study. *Sleep*, v. 37, n. 4, p. 655–663, 04 2014. ISSN 0161-8105. Disponível em: <<https://doi.org/10.5665/sleep.3562>>.

BLISS, T. V. P.; LÔMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, v. 232, n. 2, p. 331–356, jul. 1973. ISSN 0022-3751, 1469-7793.

Disponível em: <<https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>>.

BORN, J.; WILHELM, I. System consolidation of memory during sleep. *Psychological Research*, v. 76, n. 2, p. 192–203, mar. 2012. ISSN 0340-0727, 1430-2772. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00426-011-0335-6>>.

BOYCE, R.; GLASGOW, S. D.; WILLIAMS, S.; ADAMANTIDIS, A. Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science*, v. 352, n. 6287, p. 812–816, maio 2016. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aad5252>>.

BUZSÁKI, G. Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus*, v. 25, n. 10, p. 1073–1188, out. 2015. ISSN 1050-9631, 1098-1063. Number: 10. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.22488>>.

CAMINA, E.; GÜELL, F. The Neuroanatomical, Neurophysiological and Psychological Basis of Memory: Current Models and Their Origins. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, p. 438, jun. 2017. ISSN 1663-9812. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00438/full>>.

CARLÉN, M. What constitutes the prefrontal cortex? *Science*, v. 358, n. 6362, p. 478–482, 2017. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.aan8868>>.

CARR, M. F.; JADHAV, S. P.; FRANK, L. M. Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nature Neuroscience*, v. 14, n. 2, p. 147–153, fev. 2011. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn.2732>>.

CHEN, P.; BAN, W.; WANG, W.; YOU, Y.; YANG, Z. The Devastating Effects of Sleep Deprivation on Memory: Lessons from Rodent Models. *Clocks & Sleep*, v. 5, n. 2, p. 276–294, maio 2023. ISSN 2624-5175. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2624-5175/5/2/22>>.

CIRELLI, C.; TONONI, G. The why and how of sleep-dependent synaptic down-selection. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 125, p. 91–100, maio 2022. ISSN 10849521. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952121000318>>.

COOKE, S. F. Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, v. 129, n. 7, p. 1659–1673, jul. 2006. ISSN 0006-8950, 1460-2156. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awl082>>.

COTA, V. R.; OLIVEIRA, J. C. D.; DAMÁZIO, L. C. M.; MORAES, M. F. D. Nonperiodic stimulation for the treatment of refractory epilepsy: Applications, mechanisms, and novel insights. *Epilepsy & Behavior*, v. 121, p. 106609, ago. 2021. ISSN 15255050. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525505019306237>>.

DALGALARRONDO, P. *Psicopatologia e Semiologia dos Transtornos Mentais*. 3a ed. ed. [S.l.]: Editora Artmed, 2018. OCLC: 970594100. ISBN 9788582715062.

DATTA, S. Avoidance Task Training Potentiates Phasic Pontine-Wave Density in the Rat: A Mechanism for Sleep-Dependent Plasticity. *The Journal of Neuroscience*,

v. 20, n. 22, p. 8607–8613, nov. 2000. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.20-22-08607.2000>>.

DECEUNINCK, L.; KLOOSTERMAN, F. Disruption of awake sharp-wave ripples does not affect memorization of locations in repeated-acquisition spatial memory tasks. *eLife*, v. 13, p. e84004, mar. 2024. ISSN 2050-084X. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/84004>>.

DHAWAN, S. S.; PINTER, C.; LEE, A. C.; ITO, R. Male rodent perirhinal cortex, but not ventral hippocampus, inhibition induces approach bias under object-based approach-avoidance conflict. *eLife*, v. 12, p. e81467, jun. 2023. ISSN 2050-084X. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/81467>>.

DIBA, K.; BUZSÁKI, G. Forward and reverse hippocampal place-cell sequences during ripples. *Nature Neuroscience*, v. 10, n. 10, p. 1241–1242, out. 2007. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn1961>>.

DICKERSON, B. C.; EICHENBAUM, H. The Episodic Memory System: Neurocircuitry and Disorders. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 1, p. 86–104, jan. 2010. ISSN 0893-133X, 1740-634X. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/npp2009126>>.

DIEKELMANN, S.; BORN, J. The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 11, n. 2, p. 114–126, fev. 2010. ISSN 1471-003X, 1471-0048. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrn2762>>.

DJONLAGIC, I.; SABOISKY, J.; CARUSONA, A.; STICKGOLD, R.; MALHOTRA, A. Increased Sleep Fragmentation Leads to Impaired Off-Line Consolidation of Motor Memories in Humans. *PLoS ONE*, v. 7, n. 3, p. e34106, mar. 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034106>>.

DONGEN, H. P. V.; MAISLIN, G.; MULLINGTON, J. M.; DINGES, D. F. The Cumulative Cost of Additional Wakefulness: Dose-Response Effects on Neurobehavioral Functions and Sleep Physiology From Chronic Sleep Restriction and Total Sleep Deprivation. *Sleep*, v. 26, n. 2, p. 117–126, mar. 2003. ISSN 1550-9109, 0161-8105. Disponível em: <<https://academic.oup.com/sleep/article-lookup/doi/10.1093/sleep/26.2.117>>.

DRAGOI, G.; HARRIS, K. D.; BUZSÁKI, G. Place Representation within Hippocampal Networks Is Modified by Long-Term Potentiation. *Neuron*, v. 39, n. 5, p. 843–853, ago. 2003. ISSN 08966273. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627303004653>>.

DUDAI, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, v. 55, n. 1, p. 51–86, fev. 2004. ISSN 0066-4308, 1545-2085. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>>.

DUDAI, Y.; MORRIS, R. Memorable Trends. *Neuron*, v. 80, n. 3, p. 742–750, out. 2013. ISSN 08966273. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627313008702>>.

DUPRET, D.; O'NEILL, J.; PLEYDELL-BOUVERIE, B.; CSICSVARI, J. The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory

- performance. *Nature Neuroscience*, v. 13, n. 8, p. 995–1002, ago. 2010. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn.2599>>.
- DUTTA, S.; ACKERMANN, E.; KEMERE, C. Analysis of an open source, closed-loop, realtime system for hippocampal sharp-wave ripple disruption. *Journal of Neural Engineering*, v. 16, n. 1, p. 016009, fev. 2019. ISSN 1741-2560, 1741-2552. Number: 1. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2552/aae90e>>.
- EGO-STENGEL, V.; WILSON, M. A. Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus*, p. NA–NA, 2010. ISSN 10509631, 10981063. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.20707>>.
- EICHENBAUM, H.; COHEN, N. J. *From Conditioning to Conscious Recollection: Memory systems of the brain*. Oxford University Press, 2004. ISBN 9780195178043. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195178043.001.0001>>.
- EKSTROM, A. D.; ARNOLD, A. E. G. F.; IARIA, G. A critical review of the allocentric spatial representation and its neural underpinnings: toward a network-based perspective. *Frontiers in Human Neuroscience*, v. 8, out. 2014. ISSN 1662-5161. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2014.00803/abstract>>.
- ESCHENKO, O.; RAMADAN, W.; MÖLLE, M.; BORN, J.; SARA, S. J. Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learning & Memory*, v. 15, n. 4, p. 222–228, abr. 2008. ISSN 1072-0502, 1549-5485. Disponível em: <<http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.726008>>.
- EUSTON, D.; GRUBER, A.; MCNAUGHTON, B. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron*, v. 76, n. 6, p. 1057–1070, dez. 2012. ISSN 08966273. Number: 6. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627312011087>>.
- FERNÁNDEZ-RUIZ, A.; OLIVA, A.; OLIVEIRA, E. F. D.; ROCHA-ALMEIDA, F.; TINGLEY, D.; BUZSÁKI, G. Long-duration hippocampal sharp wave ripples improve memory. *Science*, v. 364, n. 6445, p. 1082–1086, jun. 2019. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aax0758>>.
- FINDLAY, G.; TONONI, G.; CIRELLI, C. The evolving view of replay and its functions in wake and sleep. *SLEEP Advances*, v. 1, n. 1, p. zpab002, mar. 2020. ISSN 2632-5012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/sleepadvances/article/doi/10.1093/sleepadvances/zpab002/6124581>>.
- FOGEL, S.; SMITH, C.; COTE, K. Dissociable learning-dependent changes in REM and non-REM sleep in declarative and procedural memory systems. *Behavioural Brain Research*, v. 180, n. 1, p. 48–61, jun. 2007. ISSN 01664328. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432807001179>>.
- FOSTER, D. J.; WILSON, M. A. Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature*, v. 440, n. 7084, p. 680–683, mar. 2006. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature04587>>.

- FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, n. 2, p. 119–130, fev. 2005. ISSN 1471-003X, 1471-0048. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrn1607>>.
- GABBOTT, P. L.; DICKIE, B. G.; VAID, R. R.; HEADLAM, A. J.; BACON, S. J. Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: Morphology and quantitative distribution. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 377, n. 4, p. 465–499, jan. 1997. ISSN 0021-9967, 1096-9861. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970127\)377:4<465::AID-CNE1>3.0.CO;2-0](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-9861(19970127)377:4<465::AID-CNE1>3.0.CO;2-0)>.
- GAWEL, K.; GIBULA, E.; MARSZALEK-GRABSKA, M.; FILAROWSKA, J.; KOTLINSKA, J. H. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 392, n. 1, p. 1–18, jan. 2019. ISSN 0028-1298, 1432-1912. Number: 1. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00210-018-1589-y>>.
- GE, C.; CHEN, W.; ZHANG, L.; AI, Y.; ZOU, Y.; PENG, Q. Hippocampus-prefrontal cortex inputs modulate spatial learning and memory in a mouse model of sepsis induced by cecal ligation puncture. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 29, n. 1, p. 390–401, jan. 2023. ISSN 1755-5930, 1755-5949. Number: 1. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cns.14013>>.
- GENZEL, L.; ROSSATO, J. I.; JACOBSE, J.; GRIEVES, R. M.; SPOONER, P. A.; BATTAGLIA, F. P.; FERNÁNDEZ, G.; MORRIS, R. G. M. The Yin and Yang of Memory Consolidation: Hippocampal and Neocortical. *PLOS Biology*, v. 15, n. 1, p. e2000531, jan. 2017. ISSN 1545-7885. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.2000531>>.
- GILMARTIN, M. R.; MIYAWAKI, H.; HELMSTETTER, F. J.; DIBA, K. Prefrontal Activity Links Nonoverlapping Events in Memory. *Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 26, p. 10910–10914, jun. 2013. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.0144-13.2013>>.
- GIRARDEAU, G.; BENCHENANE, K.; WIENER, S. I.; BUZSÁKI, G.; ZUGARO, M. B. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nature Neuroscience*, v. 12, n. 10, p. 1222–1223, out. 2009. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Number: 10. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn.2384>>.
- GIRARDEAU, G.; CEI, A.; ZUGARO, M. Learning-Induced Plasticity Regulates Hippocampal Sharp Wave-Ripple Drive. *The Journal of Neuroscience*, v. 34, n. 15, p. 5176–5183, abr. 2014. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.4288-13.2014>>.
- GIRARDEAU, G.; INEMA, I.; BUZSÁKI, G. Reactivations of emotional memory in the hippocampus–amygdala system during sleep. *Nature Neuroscience*, v. 20, n. 11, p. 1634–1642, nov. 2017. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn.4637>>.
- GIRARDEAU, G.; SANTOS, V. L. dos. Brain neural patterns and the memory function of sleep. *Science*, v. 374, n. 6567, p. 560–564, 2021. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.abi8370>>.

- GIRARDEAU, G.; ZUGARO, M. Hippocampal ripples and memory consolidation. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 21, n. 3, p. 452–459, jun. 2011. ISSN 09594388. Number: 3. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438811000316>>.
- GIRI, B.; MIYAWAKI, H.; MIZUSEKI, K.; CHENG, S.; DIBA, K. Hippocampal Reactivation Extends for Several Hours Following Novel Experience. *The Journal of Neuroscience*, v. 39, n. 5, p. 866–875, jan. 2019. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.1950-18.2018>>.
- GIUDITTA, A. Sleep memory processing: the sequential hypothesis. *Frontiers in Systems Neuroscience*, v. 8, dez. 2014. ISSN 1662-5137. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2014.00219/abstract>>.
- GIUDITTA, A.; AMBROSINI, M. V.; MONTAGNESE, P.; MANDILE, P.; COTUGNO, M.; ZUCCONI, G. G.; VESCIA, S. The sequential hypothesis of the function of sleep. *Behavioural Brain Research*, v. 69, n. 1-2, p. 157–166, jul. 1995. ISSN 01664328. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016643289500012I>>.
- GOTO, A.; BOTA, A.; MIYA, K.; WANG, J.; TSUKAMOTO, S.; JIANG, X.; HIRAI, D.; MURAYAMA, M.; MATSUDA, T.; MCHUGH, T. J.; NAGAI, T.; HAYASHI, Y. Stepwise synaptic plasticity events drive the early phase of memory consolidation. *Science*, v. 374, n. 6569, p. 857–863, 2021. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.abj9195>>.
- GOTO, A.; HAYASHI, Y. Offline neuronal activity and synaptic plasticity during sleep and memory consolidation. *Neuroscience Research*, v. 189, p. 29–36, abr. 2023. ISSN 01680102. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010222003224>>.
- GRECH, A. M.; NAKAMURA, J. P.; HILL, R. A. The Importance of Distinguishing Allocentric and Egocentric Search Strategies in Rodent Hippocampal-Dependent Spatial Memory Paradigms: Getting More Out of Your Data. In: STUICHLIK, A. (Ed.). *The Hippocampus - Plasticity and Functions*. [S.l.]: InTech, 2018. ISBN 978-1-78923-356-8 978-1-78923-357-5.
- HAN, X.; CHOW, B. Y.; ZHOU, H.; KLAPOETKE, N. C.; CHUONG, A.; RAJIMEHR, R.; YANG, A.; BARATTA, M. V.; WINKLE, J.; DESIMONE, R.; BOYDEN, E. S. A High-Light Sensitivity Optical Neural Silencer: Development and Application to Optogenetic Control of Non-Human Primate Cortex. *Frontiers in Systems Neuroscience*, v. 5, 2011. ISSN 1662-5137. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2011.00018/abstract>>.
- HARRISON, F. E.; REISERER, R. S.; TOMARKEN, A. J.; MCDONALD, M. P. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & Memory*, v. 13, n. 6, p. 809–819, nov. 2006. ISSN 1072-0502, 1549-5485. Disponível em: <<http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.334306>>.
- HASSELMO, M. E. acetylcholine and memory consolidation. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 3, n. 9, 1999.

HAVEKES, R.; PARK, A. J.; TUDOR, J. C.; LUCZAK, V. G.; HANSEN, R. T.; FERRI, S. L.; BRUINENBERG, V. M.; POPLAWSKI, S. G.; DAY, J. P.; ATON, S. J.; RADWAŃSKA, K.; MEERLO, P.; HOUSLAY, M. D.; BAILLIE, G. S.; ABEL, T. Sleep deprivation causes memory deficits by negatively impacting neuronal connectivity in hippocampal area CA1. *eLife*, v. 5, p. e13424, ago. 2016. ISSN 2050-084X. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/13424>>.

HAYES, M. H. *Statistical Digital Signal Processing and Modeling*. [S.l.]: Wiley, 1996. ISBN 978-0471594314.

HEBB, D. O. *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. Oxford, England: Wiley, 1949. (The organization of behavior; a neuropsychological theory.). Pages: xix, 335.

HELFRICH, R. F.; LENDNER, J. D.; MANDER, B. A.; GUILLEN, H.; PAFF, M.; MNATSAKANYAN, L.; VADERA, S.; WALKER, M. P.; LIN, J. J.; KNIGHT, R. T. Bidirectional prefrontal-hippocampal dynamics organize information transfer during sleep in humans. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 3572, ago. 2019. ISSN 2041-1723. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-019-11444-x>>.

HELLMAN, K.; ABEL, T. Fear conditioning increases NREM sleep. *Behavioral Neuroscience*, v. 121, n. 2, p. 310–323, 2007. ISSN 1939-0084, 0735-7044. Disponível em: <<https://doi.apa.org/doi/10.1037/0735-7044.121.2.310>>.

HOBSON, J. A.; PACE-SCHOTT, E. F. The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 3, n. 9, p. 679–693, set. 2002. ISSN 1471-003X, 1471-0048. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrn915>>.

HÖLSCHER, C.; ANWYL, R.; ROWAN, M. J. Stimulation on the Positive Phase of Hippocampal Theta Rhythm Induces Long-Term Potentiation That Can Be Depotentiated by Stimulation on the Negative Phase in Area CA1 *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 16, p. 6470–6477, ago. 1997. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.17-16-06470.1997>>.

HOLSCHNEIDER, D.; GIVRAD, T.; YANG, J.; STEWART, S.; FRANCIS, S.; WANG, Z.; MAAREK, J. Cerebral perfusion mapping during retrieval of spatial memory in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 375, p. 112116, dez. 2019. ISSN 01664328. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432819307934>>.

HOWLAND, J. G.; ITO, R.; LAPISH, C. C.; VILLARUEL, F. R. The rodent medial prefrontal cortex and associated circuits in orchestrating adaptive behavior under variable demands. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 135, p. 104569, abr. 2022. ISSN 01497634. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763422000586>>.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, v. 103, n. 1, p. 1–11, ago. 1999. ISSN 01664328. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432899000364>>.

- JADHAV, S. P.; KEMERE, C.; GERMAN, P. W.; FRANK, L. M. Awake Hippocampal Sharp-Wave Ripples Support Spatial Memory. *Science*, v. 336, n. 6087, p. 1454–1458, jun. 2012. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Number: 6087. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1217230>>.
- JENKINS, J. G.; DALLENBACH, K. M. Obliviscence during Sleep and Waking. *The American Journal of Psychology*, v. 35, n. 4, p. 605, out. 1924. ISSN 00029556. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/1414040?origin=crossref>>.
- JIANG, L.; LI, W.; MAMTILAHUN, M.; SONG, Y.; MA, Y.; QU, M.; LU, Y.; HE, X.; ZHENG, J.; FU, Z.; ZHANG, Z.; YANG, G.-Y.; WANG, Y. Optogenetic Inhibition of Striatal GABAergic Neuronal Activity Improves Outcomes After Ischemic Brain Injury. *Stroke*, v. 48, n. 12, p. 3375–3383, dez. 2017. ISSN 0039-2499, 1524-4628. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.117.019017>>.
- JIN, J.; MAREN, S. Prefrontal-Hippocampal Interactions in Memory and Emotion. *Frontiers in Systems Neuroscience*, v. 9, dez. 2015. ISSN 1662-5137. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnsys.2015.00170/abstract>>.
- JOINER, W. J. Neuroscience: Sleep Fragmentation Impairs Memory Formation. *Current Biology*, v. 29, n. 22, p. R1181–R1184, nov. 2019. ISSN 09609822. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982219312515>>.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J.; MACK, S. *Principles of Neural Science*. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2013. Disponível em: <[neurology.mhmedical.com/content.aspx?aid=1101675601](http://neurology.mhmedical.com/content.aspx?aid=1101675601)>.
- KARLSSON, M. P.; FRANK, L. M. Network dynamics underlying the formation of sparse, informative representations in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, Society for Neuroscience, v. 28, n. 52, p. 14271–14281, 2008. ISSN 0270-6474. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/28/52/14271>>.
- KAWAGUCHI, Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex*, v. 7, n. 6, p. 476–486, set. 1997. ISSN 14602199. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/7.6.476>>.
- KIM, J.; BUSTAMANTE, E.; SOTONYI, P.; MAXWELL, N.; PARAMESWARAN, P.; KENT, J. K.; WETSEL, W. C.; SODERBLOM, E. J.; RÁCZ, B.; SODERLING, S. H. Presynaptic Rac1 in the hippocampus selectively regulates working memory. *eLife*, v. 13, p. RP97289, jul. 2024. ISSN 2050-084X. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/97289>>.
- KITAMURA, T.; OGAWA, S. K.; ROY, D. S.; OKUYAMA, T.; MORRISSEY, M. D.; SMITH, L. M.; REDONDO, R. L.; TONEGAWA, S. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, v. 356, n. 6333, p. 73–78, abr. 2017. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aam6808>>.
- KLINZING, J. G.; NIETHARD, N.; BORN, J. Mechanisms of systems memory consolidation during sleep. *Nature Neuroscience*, v. 22, n. 10, p. 1598–1610, out. 2019. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Number: 10. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41593-019-0467-3>>.

- KUDRIMOTI, H. S.; BARNES, C. A.; MCNAUGHTON, B. L. Reactivation of Hippocampal Cell Assemblies: Effects of Behavioral State, Experience, and EEG Dynamics. *The Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 10, p. 4090–4101, maio 1999. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.19-10-04090.1999>>.
- KUMARAN, D.; HASSABIS, D.; MCCLELLAND, J. L. What Learning Systems do Intelligent Agents Need? Complementary Learning Systems Theory Updated. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 20, n. 7, p. 512–534, jul. 2016. ISSN 13646613. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364661316300432>>.
- LAFFERTY, C. K.; BRITT, J. P. Off-Target Influences of Arch-Mediated Axon Terminal Inhibition on Network Activity and Behavior. *Frontiers in Neural Circuits*, v. 14, p. 10, mar. 2020. ISSN 1662-5110. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2020.00010/full>>.
- LAROCHE, S.; DAVIS, S.; JAY, T. M. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: Dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus*, v. 10, n. 4, p. 438–446, 2000. ISSN 1050-9631, 1098-1063. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1098-1063\(2000\)10:4<438::AID-HIPO10>3.0.CO;2-3](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1098-1063(2000)10:4<438::AID-HIPO10>3.0.CO;2-3)>.
- LATCHOUMANE, C.-F. V.; NGO, H.-V. V.; BORN, J.; SHIN, H.-S. Thalamic Spindles Promote Memory Formation during Sleep through Triple Phase-Locking of Cortical, Thalamic, and Hippocampal Rhythms. *Neuron*, v. 95, n. 2, p. 424–435.e6, jul. 2017. ISSN 08966273. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627317305494>>.
- LAUBACH, M.; AMARANTE, L. M.; SWANSON, K.; WHITE, S. R. What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *eneuro*, v. 5, n. 5, p. ENEURO.0315–18.2018, set. 2018. ISSN 2373-2822. Disponível em: <<https://www.eneuro.org/lookup/doi/10.1523/ENEURO.0315-18.2018>>.
- LENDNER, J. D.; NIETHARD, N.; MANDER, B. A.; SCHALKWIJK, F. J. V.; SCHUH-HOFER, S.; SCHMIDT, H.; KNIGHT, R. T.; BORN, J.; WALKER, M. P.; LIN, J. J.; HELFRICH, R. F. Human REM sleep recalibrates neural activity in support of memory formation. *Science Advances*, v. 9, n. 34, p. eadj1895, ago. 2023. ISSN 2375-2548. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.adj1895>>.
- LENG, Y.; KNUTSON, K.; CARNETHON, M. R.; YAFFE, K. Association between sleep quantity and quality in early adulthood with cognitive function in midlife. *Neurology*, v. 102, n. 2, p. e208056, 2024. Disponível em: <<https://www.neurology.org/doi/abs/10.1212/WNL.0000000000208056>>.
- LEVY, W. B.; STEWARD, O. Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. *Brain Research*, v. 175, n. 2, p. 233–245, out. 1979. ISSN 00068993. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899379910035>>.
- LIAO, Z.; TERADA, S.; RAIKOV, I. G.; HADJIABADI, D.; SZOBOSZLAY, M.; SOLTESZ, I.; LOSONCZY, A. Inhibitory plasticity supports replay generalization in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, v. 27, n. 10, p. 1987–1998, out. 2024. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41593-024-01745-w>>.

- LIU, C.; MENG, Z.; WIGGIN, T. D.; YU, J.; REED, M. L.; GUO, F.; ZHANG, Y.; ROSBASH, M.; GRIFFITH, L. C. A Serotonin-Modulated Circuit Controls Sleep Architecture to Regulate Cognitive Function Independent of Total Sleep in *Drosophila*. *Current Biology*, v. 29, n. 21, p. 3635–3646.e5, nov. 2019. ISSN 09609822. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982219311637>>.
- LOCKLEAR, M.; KRITZER, M. Assessment of the effects of sex and sex hormones on spatial cognition in adult rats using the Barnes maze. *Hormones and Behavior*, v. 66, n. 2, p. 298–308, jul. 2014. ISSN 0018506X. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018506X14001226>>.
- LOUREIRO, M.; CHOLVIN, T.; LOPEZ, J.; MERIENNE, N.; LATRECHE, A.; COSQUER, B.; GEIGER, K.; KELCHE, C.; CASSEL, J.-C.; VASCONCELOS, A. P. D. The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats. *Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 29, p. 9947–9959, jul. 2012. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.0410-12.2012>>.
- MAHON, B. Z.; CARAMAZZA, A. A critical look at the embodied cognition hypothesis and a new proposal for grounding conceptual content. *Journal of Physiology-Paris*, v. 102, n. 1-3, p. 59–70, jan. 2008. ISSN 09284257. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928425708000193>>.
- MAINGRET, N.; GIRARDEAU, G.; TODOROVA, R.; GOUTIERRE, M.; ZUGARO, M. Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nature Neuroscience*, v. 19, n. 7, p. 959–964, jul. 2016. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Number: 7. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn.4304>>.
- MARR, D. Simple memory: a theory for archicortex. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological sciences*, v. 262, n. 841, p. 23–81, 1971. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.1971.0078>>.
- MARSHALL, L.; CROSS, N.; BINDER, S.; DANG-VU, T. T. Brain Rhythms During Sleep and Memory Consolidation: Neurobiological Insights. *Physiology*, v. 35, n. 1, p. 4–15, jan. 2020. ISSN 1548-9213, 1548-9221. Number: 1. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physiol.00004.2019>>.
- MARSHALL, L.; HELGADÓTTIR, H.; MÖLLE, M.; BORN, J. Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature*, v. 444, n. 7119, p. 610–613, nov. 2006. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature05278>>.
- MATHIS, A.; MAMIDANNA, P.; CURY, K. M.; ABE, T.; MURTHY, V. N.; MATHIS, M. W.; BETHGE, M. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature Neuroscience*, v. 21, n. 9, p. 1281–1289, set. 2018. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41593-018-0209-y>>.
- MCCLELLAND, J. L.; MCNAUGHTON, B. L.; O'REILLY, R. C. Why There Are Complementary Learning Systems in the Hippocampus and Neocortex: Insights From the Successes and Failures of Connectionist Models of Learning and Memory. *Psychological Review*, v. 103, n. 3, 1995.

- MELLO, M.; SANTANA, M.; SOUZA, L.; OLIVEIRA, P.; VENTURA, M.; STAMPI, C.; TUFIK, S. Sleep patterns and sleep-related complaints of Brazilian interstate bus drivers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 1, p. 71–77, jan. 2000. ISSN 0100-879X. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2000000100010&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2000000100010&lng=en&tlng=en)>.
- MELLO, M. T. de. TRABALHO NOTURNO E EM TURNOS: REPERCUSSÕES NA SAÚDE E NOS ACIDENTES DO TRABALHo. v. 80, n. 1, 2014.
- MEMAR, P.; FARADJI, F. A Novel Multi-Class EEG-Based Sleep Stage Classification System. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, v. 26, n. 1, p. 84–95, jan. 2018. ISSN 1534-4320, 1558-0210. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/8116601/>>.
- MENDES, R. A. V. *Desenvolvimento e Validação de um Toolbox de Código Aberto para Classificação de Sono de Roedores*. Tese (Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2021. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia.
- MILNER, B. Physiologie de l'hippocampe: Colloque international, no. 107, editions du centre national de la recherche scientifique, paris, 1962. 512 pp. 58nf. *Neuropsychologia*, v. 3, p. 273–277, 1965. Disponível em: <<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:141235351>>.
- MIYAWAKI, H.; DIBA, K. Regulation of Hippocampal Firing by Network Oscillations during Sleep. *Current Biology*, v. 26, n. 7, p. 893–902, abr. 2016. ISSN 09609822. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982216300768>>.
- MOSER, E.; MOSER, M.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *The Journal of Neuroscience*, v. 13, n. 9, p. 3916–3925, set. 1993. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.13-09-03916.1993>>.
- MOSER, M.-B.; ROWLAND, D. C.; MOSER, E. I. Place Cells, Grid Cells, and Memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 2, p. a021808, fev. 2015. ISSN 1943-0264. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a021808>>.
- NEGRÓN-OYARZO, I.; ESPINOSA, N.; AGUILAR-RIVERA, M.; FUENZALIDA, M.; ABOITIZ, F.; FUENTEALBA, P. Coordinated prefrontal–hippocampal activity and navigation strategy-related prefrontal firing during spatial memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, n. 27, p. 7123–7128, jul. 2018. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Number: 27. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1720117115>>.
- NISHIDA, M.; PEARSALL, J.; BUCKNER, R. L.; WALKER, M. P. REM Sleep, Prefrontal Theta, and the Consolidation of Human Emotional Memory. *Cerebral Cortex*, v. 19, n. 5, p. 1158–1166, maio 2009. ISSN 1047-3211, 1460-2199. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/bhn155>>.

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*, v. 359, n. 6383, p. 1524–1527, mar. 2018. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Number: 6383. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aao0702>>.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, v. 34, n. 1, p. 171–175, nov. 1971. ISSN 00068993. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899371903581>>.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford, New York: Clarendon Press ; Oxford University Press, 1978. OCLC: 4430731. ISBN 978-0-19-857206-0.

OKUDA, M.; NODA, A.; MABUCHI, S.; IWAMOTO, K.; BANNO, M.; MIYATA, S.; YASUMA, F.; OZAKI, N. Sleep fragmentation and working memory in healthy adults. *Sleep Science*, v. 14, n. S 02, p. 111–117, jun. 2021. ISSN 1984-0659, 1984-0063. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.5935/1984-0063.20200088>>.

OLIVA, A.; FERNÁNDEZ-RUIZ, A.; LEROY, F.; SIEGELBAUM, S. A. Hippocampal CA2 sharp-wave ripples reactivate and promote social memory. *Nature*, v. 587, n. 7833, p. 264–269, nov. 2020. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Number: 7833. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2758-y>>.

PASTALKOVA, E.; SERRANO, P.; PINKHASOVA, D.; WALLACE, E.; FENTON, A. A.; SACKTOR, T. C. Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP. *Science*, v. 313, n. 5790, p. 1141–1144, ago. 2006. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1128657>>.

PAUSE, B. M.; ZLOMUZICA, A.; KINUGAWA, K.; MARIANI, J.; PIETROWSKY, R.; DERE, E. Perspectives on Episodic-Like and Episodic Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 7, 2013. ISSN 1662-5153. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2013.00033/abstract>>.

PAVLIDES, C.; WINSON, J. Influences of hippocampal place cell firing in the awake state on the activity of these cells during subsequent sleep episodes. *The Journal of Neuroscience*, v. 9, n. 8, p. 2907–2918, ago. 1989. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.09-08-02907.1989>>.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Compact 6th ed. Amsterdam: Elsevier, 2009. OCLC: 970594100. ISBN 978-0-12-374876-8.

PETERS, K. R.; SMITH, V.; SMITH, C. T. Changes in Sleep Architecture following Motor Learning Depend on Initial Skill Level. *Journal of Cognitive Neuroscience*, v. 19, n. 5, p. 817–829, maio 2007. ISSN 0898-929X, 1530-8898. Disponível em: <<https://direct.mit.edu/jocn/article/19/5/817/4323/Changes-in-Sleep-Architecture-following-Motor>>.

PITTS, M. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *BIO-PROTOCOL*, v. 8, n. 5, 2018. ISSN 2331-8325. Disponível em: <<https://bio-protocol.org/e2744>>.

- POE, G. R.; NITZ, D. A.; MCNAUGHTON, B. L.; BARNES, C. A. Experience-dependent phase-reversal of hippocampal neuron firing during REM sleep. *Brain Research*, v. 855, n. 1, p. 176–180, fev. 2000. ISSN 00068993. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899399023100>>.
- POE, G. R.; WALSH, C. M.; BJORNESS, T. E. Cognitive neuroscience of sleep. In: *Progress in Brain Research*. Elsevier, 2010. v. 185, p. 1–19. ISBN 978-0-444-53702-7. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444537027000014>>.
- POLANCZYK, R. S. *Papel do Acoplamento Hipocampo-Pré-frontal para a Formação de Memória Espacial Durante o Sono*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2023. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia.
- POPA, D.; DUVARCI, S.; POPESCU, A. T.; LÉNA, C.; PARÉ, D. Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 14, p. 6516–6519, abr. 2010. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0913016107>>.
- PRESTON, A.; EICHENBAUM, H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. *Current Biology*, v. 23, n. 17, p. R764–R773, set. 2013. ISSN 09609822. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982213006362>>.
- PRIDA, L. M. D. L. Potential factors influencing replay across CA1 during sharp-wave ripples. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 375, n. 1799, p. 20190236, maio 2020. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2019.0236>>.
- RAJASETHUPATHY, P.; SANKARAN, S.; MARSH, J. H.; KIM, C. K.; FERENCZI, E.; LEE, S. Y.; BERNDT, A.; RAMAKRISHNAN, C.; JAFFE, A.; LO, M.; LISTON, C.; DEISSEROTH, K. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature*, v. 526, n. 7575, p. 653–659, out. 2015. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature15389>>.
- RAMADAN, W.; ESCHENKO, O.; SARA, S. J. Hippocampal Sharp Wave/Ripples during Sleep for Consolidation of Associative Memory. *PLoS ONE*, v. 4, n. 8, p. e6697, ago. 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006697>>.
- RASCH, B.; BORN, J. About Sleep's Role in Memory. *Physiological Reviews*, v. 93, n. 2, p. 681–766, abr. 2013. ISSN 0031-9333, 1522-1210. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00032.2012>>.
- RÊGO, D. G. *Estudos das Relações entre Idade, Parâmetros Cognitivos Espaciais e a Atividade do Sistema Serotoninérgico no Hipocampo de Ratos*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2014. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.
- REGO, I. M. G. *Efeitos da Cocaína e da Privação de Sono Sobre Oscilações Hipocampo-Corticais, Sono e Memória*. Tese (Mestrado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2022. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia.

- REYNOLDS, D. Gaussian mixture models. In: \_\_\_\_\_. *Encyclopedia of Biometrics*. Boston, MA: Springer US, 2009. p. 659–663. ISBN 978-0-387-73003-5. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-0-387-73003-5\\_196](https://doi.org/10.1007/978-0-387-73003-5_196)>.
- RIBEIRO, S. Novel experience induces persistent sleep-dependent plasticity in the cortex but not in the hippocampus. *Frontiers in Neuroscience*, v. 1, n. 1, p. 43–55, nov. 2007. ISSN 16624548. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/neuro.01.1.1.003.2007/abstract>>.
- RIBEIRO, S. *O oráculo da noite: a história e a ciência do sonho*. São Paulo: Companhia das Letras, 2019. OCLC: 970594100. ISBN 978-85-3593-217-1.
- RIBEIRO, S.; MELLO, C. V.; VELHO, T.; GARDNER, T. J.; JARVIS, E. D.; PAVLIDES, C. Induction of Hippocampal Long-Term Potentiation during Waking Leads to Increased Extrahippocampal *zif-268* Expression during Ensuing Rapid-Eye-Movement Sleep. *The Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 24, p. 10914–10923, dez. 2002. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.22-24-10914.2002>>.
- RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Structural Evidence for Functional Domains in the Rat Hippocampus. *Science*, v. 272, n. 5267, p. 1484–1486, jun. 1996. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.272.5267.1484>>.
- ROLLS, A.; COLAS, D.; ADAMANTIDIS, A.; CARTER, M.; LANRE-AMOS, T.; HELLER, H. C.; LECEA, L. D. Optogenetic disruption of sleep continuity impairs memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 32, p. 13305–13310, ago. 2011. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1015633108>>.
- ROZESKE, R. R.; VALERIO, S.; CHAUDUN, F.; HERRY, C. Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes, Brain and Behavior*, v. 14, n. 1, p. 22–36, jan. 2015. ISSN 1601-1848, 1601-183X. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gbb.12181>>.
- RUGGIERO, R. N.; ROSSIGNOLI, M. T.; MARQUES, D. B.; SOUSA, B. M. D.; ROMCY-PEREIRA, R. N.; LOPES-AGUIAR, C.; LEITE, J. P. Neuromodulation of Hippocampal-Prefrontal Cortical Synaptic Plasticity and Functional Connectivity: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 15, p. 732360, out. 2021. ISSN 1662-5102. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2021.732360/full>>.
- SADEGHIAN, A.; FATHOLLAHI, Y.; JAVAN, M.; SHOJAEI, A.; KOSARMADAR, N.; REZAEI, M.; MIRNAJAFI-ZADEH, J.; ZARE, M. Spatial Learning and Memory in Barnes Maze Test and Synaptic Potentiation in Schaffer Collateral-CA1 Synapses of Dorsal Hippocampus in Freely Moving Rats. *Basic and Clinical Neuroscience Journal*, p. 461–468, nov. 2019. ISSN 22287442, 2008126X. Disponível em: <<http://bcn.iums.ac.ir/article-1-1324-en.html>>.
- SADOWSKI, J.; JONES, M.; MELLOR, J. Sharp-Wave Ripples Orchestrate the Induction of Synaptic Plasticity during Reactivation of Place Cell Firing Patterns in the Hippocampus. *Cell Reports*, v. 14, n. 8, p. 1916–1929, mar. 2016. ISSN 22111247. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716300390>>.

- SARA, S. J. Sleep to Remember. *The Journal of Neuroscience*, v. 37, n. 3, p. 457–463, jan. 2017. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.0297-16.2017>>.
- SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2009.
- SHIN, M. E.; PARRA-BUENO, P.; YASUDA, R. *Formation of long-term memory without short-term memory by CaMKII inhibition*. 2024. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.01.28.577644>>.
- SIEGLE, J. H.; LÓPEZ, A. C.; PATEL, Y. A.; ABRAMOV, K.; OHAYON, S.; VOIGTS, J. Open Ephys: an open-source, plugin-based platform for multichannel electrophysiology. *Journal of Neural Engineering*, v. 14, n. 4, p. 045003, ago. 2017. ISSN 1741-2560, 1741-2552. Number: 4. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2552/aa5eea>>.
- SIGURDSSON, T.; DUVARCI, S. Hippocampal-Prefrontal Interactions in Cognition, Behavior and Psychiatric Disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*, v. 9, jan. 2016. ISSN 1662-5137. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnsys.2015.00190/abstract>>.
- SIMASKO, S. M.; MUKHERJEE, S. Novel analysis of sleep patterns in rats separates periods of vigilance cycling from long-duration wake events. *Behavioural Brain Research*, v. 196, n. 2, p. 228–236, jan. 2009. ISSN 01664328. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432808005056>>.
- SKAGGS, W. E.; MCNAUGHTON, B. L. Replay of Neuronal Firing Sequences in Rat Hippocampus During Sleep Following Spatial Experience. *Science*, v. 271, n. 5257, p. 1870–1873, mar. 1996. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.271.5257.1870>>.
- SMITH, C. Sleep states, memory processes and synaptic plasticity. *Behavioural Brain Research*, v. 78, n. 1, p. 49–56, jun. 1996. ISSN 01664328. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166432895002189>>.
- SMITH, C. T.; NIXON, M. R.; NADER, R. S. Posttraining increases in REM sleep intensity implicate REM sleep in memory processing and provide a biological marker of learning potential. *Learning & Memory*, v. 11, n. 6, p. 714–719, nov. 2004. ISSN 1072-0502, 1549-5485. Disponível em: <<http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.74904>>.
- SOUSA, B. M. D.; OLIVEIRA, E. F. D.; BERALDO, I. J. D. S.; POLANCZYK, R. S.; LEITE, J. P.; AGUIAR, C. L. An open-source, ready-to-use and validated ripple detector plugin for the Open Ephys GUI. *Journal of Neural Engineering*, v. 19, n. 4, p. 046040, ago. 2022. ISSN 1741-2560, 1741-2552. Number: 4. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2552/ac857b>>.
- SPARTA, D. R.; STAMATAKIS, A. M.; PHILLIPS, J. L.; HOVELSØ, N.; ZESSEN, R. V.; STUBER, G. D. Construction of implantable optical fibers for long-term optogenetic manipulation of neural circuits. *Nature Protocols*, v. 7, n. 1, p. 12–23, jan. 2012. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nprot.2011.413>>.

- SQUIRE, L. R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 82, n. 3, p. 171–177, nov. 2004. ISSN 10747427. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742704000735>>.
- SQUIRE, L. R. The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron*, v. 61, n. 1, p. 6–9, jan. 2009. ISSN 08966273. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627308010957>>.
- SQUIRE, L. R. Memory and Brain Systems: 1969–2009. *The Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 41, p. 12711–12716, out. 2009. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3575-09.2009>>.
- SQUIRE, L. R.; GENZEL, L.; WIXTED, J. T.; MORRIS, R. G. Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 8, p. a021766, ago. 2015. ISSN 1943-0264. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a021766>>.
- STARESINA, B. P.; BERGMANN, T. O.; BONNEFOND, M.; MEIJ, R. V. D.; JENSEN, O.; DEUKER, L.; ELGER, C. E.; AXMACHER, N.; FELL, J. Hierarchical nesting of slow oscillations, spindles and ripples in the human hippocampus during sleep. *Nature Neuroscience*, v. 18, n. 11, p. 1679–1686, nov. 2015. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm.4119>>.
- STEFANIK, M. T.; MOUSSAWI, K.; KUPCHIK, Y. M.; SMITH, K. C.; MILLER, R. L.; HUFF, M. L.; DEISSEROTH, K.; KALIVAS, P. W.; LALUMIERE, R. T. Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats. *Addiction Biology*, v. 18, n. 1, p. 50–53, jan. 2013. ISSN 1355-6215, 1369-1600. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1369-1600.2012.00479.x>>.
- STEPANSKI, E. J. The Effect of Sleep Fragmentation on Daytime Function. 2002.
- STRANGE, B. A.; WITTER, M. P.; LEIN, E. S.; MOSER, E. I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 15, n. 10, p. 655–669, out. 2014. ISSN 1471-003X, 1471-0048. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrn3785>>.
- SWANSON, L. A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Research*, v. 217, n. 1, p. 150–154, jul. 1981. ISSN 00068993. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000689938190192X>>.
- TAKASHIMA, A.; PETERSSON, K. M.; RUTTERS, F.; TENDOLKAR, I.; JENSEN, O.; ZWARTS, M. J.; MCNAUGHTON, B. L.; FERNÁNDEZ, G. Declarative memory consolidation in humans: A prospective functional magnetic resonance imaging study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 3, p. 756–761, jan. 2006. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0507774103>>.
- TAKEUCHI, T.; DUSZKIEWICZ, A. J.; MORRIS, R. G. M. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1633, p. 20130288, jan. 2014. ISSN 0962-8436, 1471-2970. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2013.0288>>.

- THORLABS. *T-Cube LED Driver LEDD1B Operation Manual*. 2023. Disponível em: <<https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=LEDD1B>>.
- TODOROVA, R.; ZUGARO, M. Isolated cortical computations during delta waves support memory consolidation. *Science*, v. 366, n. 6463, p. 377–381, out. 2019. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Number: 6463. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aay0616>>.
- TONONI, G.; CIRELLI, C. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Research Bulletin*, v. 62, n. 2, p. 143–150, dez. 2003. ISSN 03619230. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923003002594>>.
- TONONI, G.; CIRELLI, C. Sleep and synaptic down-selection. *European Journal of Neuroscience*, v. 51, n. 1, p. 413–421, jan. 2020. ISSN 0953-816X, 1460-9568. Number: 1. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejn.14335>>.
- TURRIGIANO, G. G. Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends in Neurosciences*, v. 22, n. 5, p. 221–227, 1999. ISSN 0166-2236. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223698013411>>.
- URIARTE, M.; OGUNDELE, O. M.; PARDO, J. Long-lasting training in the Barnes maze prompts hippocampal spinogenesis and habituation in rats. *NeuroReport*, v. 28, n. 6, p. 307–312, abr. 2017. ISSN 0959-4965. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00001756-201705010-00002>>.
- VALATX, J.; JOUVET, D.; JOUVET, M. Eeg evolution of the different states of sleep in the kitten. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, v. 17, n. 3, p. 218–233, 1964. ISSN 0013-4694. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0013469464901233>>.
- VEN, G. M. V. D.; TROUCHE, S.; MCNAMARA, C. G.; ALLEN, K.; DUPRET, D. Hippocampal Offline Reactivation Consolidates Recently Formed Cell Assembly Patterns during Sharp Wave-Ripples. *Neuron*, v. 92, n. 5, p. 968–974, dez. 2016. ISSN 08966273. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627316307218>>.
- VERTES, R. P.; EASTMAN, K. E. The case against memory consolidation in rem sleep. *Behavioral and Brain Sciences*, v. 23, n. 6, p. 867–876, 2000.
- VERTES, R. P.; LINLEY, S. B.; VIENA, T. D. Nucleus reuniens: Circuitry, function, and dysfunction. In: \_\_\_\_\_. *Electrophysiological Recording Techniques*. New York, NY: Springer US, 2022. p. 55–101. ISBN 978-1-0716-2631-3. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2631-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2631-3_4)>.
- VITUREIRA, N.; GODA, Y. The interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity. *Journal of Cell Biology*, v. 203, n. 2, p. 175–186, out. 2013. ISSN 1540-8140, 0021-9525. Disponível em: <<https://rupress.org/jcb/article/203/2/175/54552/The-interplay-between-Hebbian-and-homeostatic>>.
- VOGEL, P.; HAHN, J.; DUVARCI, S.; SIGURDSSON, T. Prefrontal pyramidal neurons are critical for all phases of working memory. *Cell Reports*, v. 39, n. 2, p. 110659, abr. 2022. ISSN 22111247. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124722004119>>.

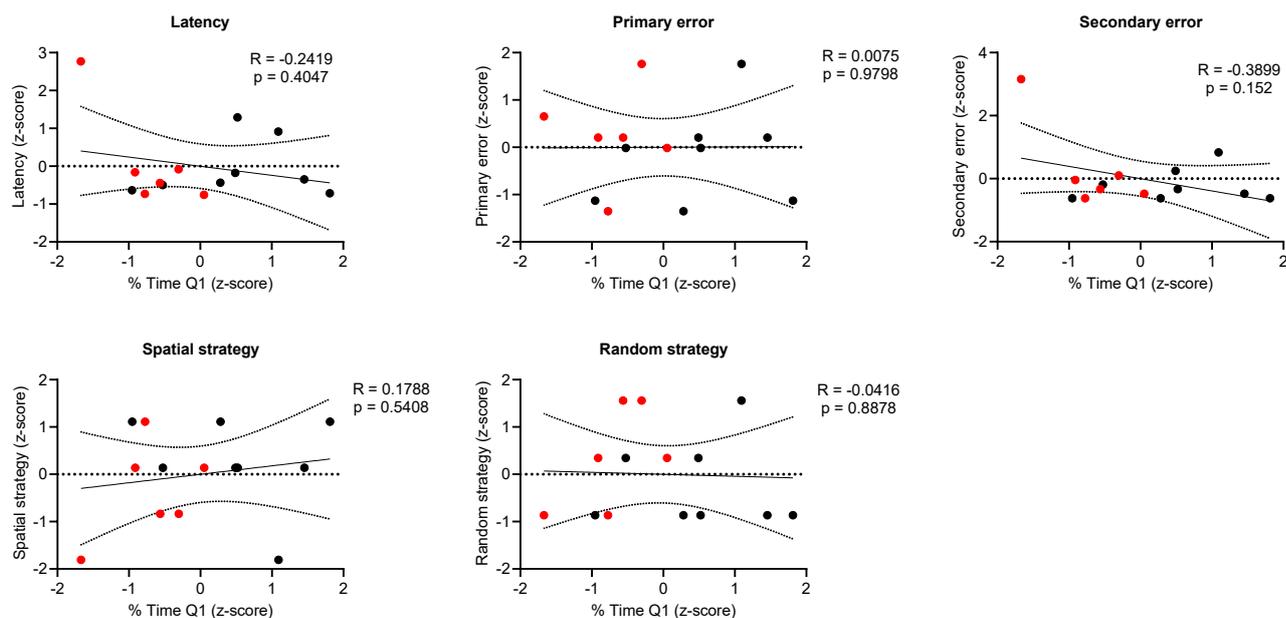
- VYAZOVSKIY, V. V.; CIRELLI, C.; PFISTER-GENSKOW, M.; FARAGUNA, U.; TONONI, G. Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nature Neuroscience*, v. 11, n. 2, p. 200–208, fev. 2008. ISSN 1097-6256, 1546-1726. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn2035>>.
- WHITLOCK, J. R.; HEYNEN, A. J.; SHULER, M. G.; BEAR, M. F. Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Science*, v. 313, n. 5790, p. 1093–1097, ago. 2006. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1128134>>.
- WILSON, M. A.; MCNAUGHTON, B. L. Reactivation of Hippocampal Ensemble Memories During Sleep. *Science*, v. 265, n. 5172, p. 676–679, jul. 1994. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.8036517>>.
- WIRT, R.; HYMAN, J. Integrating Spatial Working Memory and Remote Memory: Interactions between the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus. *Brain Sciences*, v. 7, n. 4, p. 43, abr. 2017. ISSN 2076-3425. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3425/7/4/43>>.
- WOBBROCK, J. O.; FINDLATER, L.; GERGLE, D.; HIGGINS, J. J. The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures. In: *Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems*. New York, NY, USA: Association for Computing Machinery, 2011. (CHI '11), p. 143–146. ISBN 9781450302289. Disponível em: <<https://doi.org/10.1145/1978942.1978963>>.
- XU, P.; CHEN, A.; LI, Y.; XING, X.; LU, H. The Medial Prefrontal Cortex in Neurological Diseases. *Physiological genomics*, v. 51, n. 9, 2019.
- YIZHAR, O.; FENNO, L.; DAVIDSON, T.; MOGRI, M.; DEISSEROTH, K. Optogenetics in Neural Systems. *Neuron*, v. 71, n. 1, p. 9–34, jul. 2011. ISSN 08966273. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627311005046>>.
- YLINEN, A.; BRAGIN, A.; NADASDY, Z.; JANDO, G.; SZABO, I.; SIK, A.; BUZSAKI, G. Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, v. 15, n. 1, p. 30–46, jan. 1995. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00030.1995>>.
- YOON, T.; OKADA, J.; JUNG, M. W.; KIM, J. J. Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. *Learning & Memory*, v. 15, n. 3, p. 97–105, mar. 2008. ISSN 1072-0502, 1549-5485. Disponível em: <<http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.850808>>.

# Apêndices

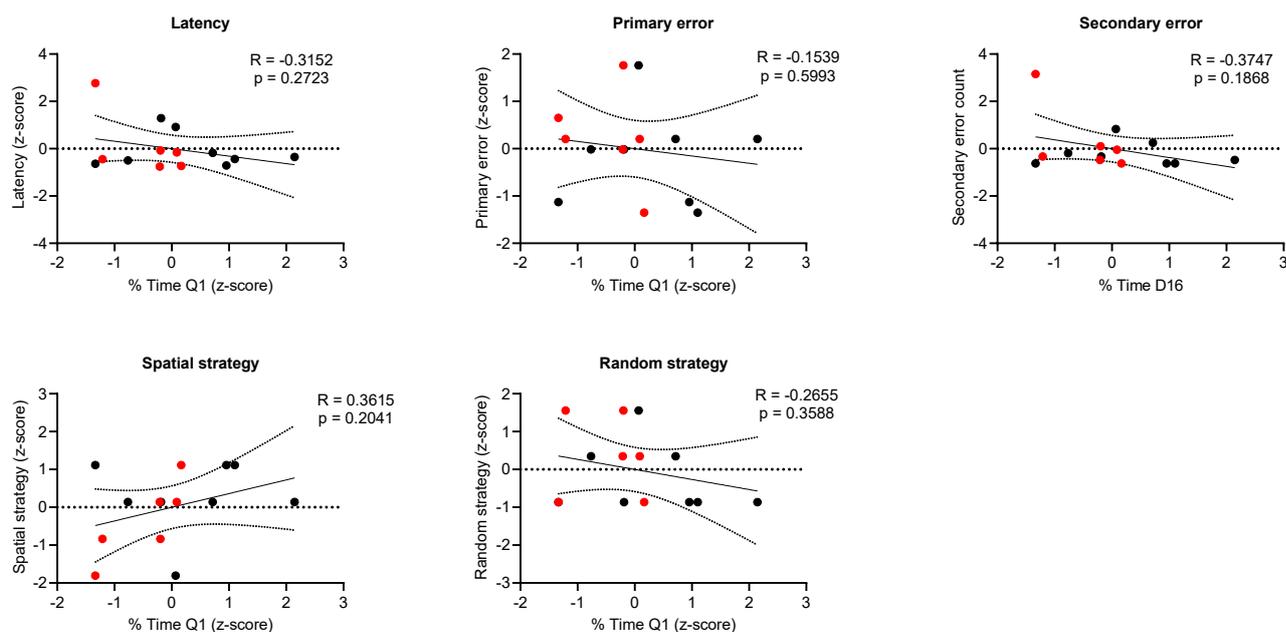
## APÊNDICE A - Figura 38

Figura 38 – Correlação entre indicadores de desempenho da aquisição (D4) e o tempo despendido no quadrante-alvo na etapa de teste (D16). Pontos pretos: animais controle; pontos vermelhos: animais perturbação de *ripples*. As retas contínuas correspondem a um modelo de regressão linear dos dados e as curvas pontilhadas indicam o erro.

### Acquisition D4 vs time in the target quadrant D16 (entire probe trial)



### Acquisition D4 vs time in the target quadrant D16 (first 30 sec. of the probe)

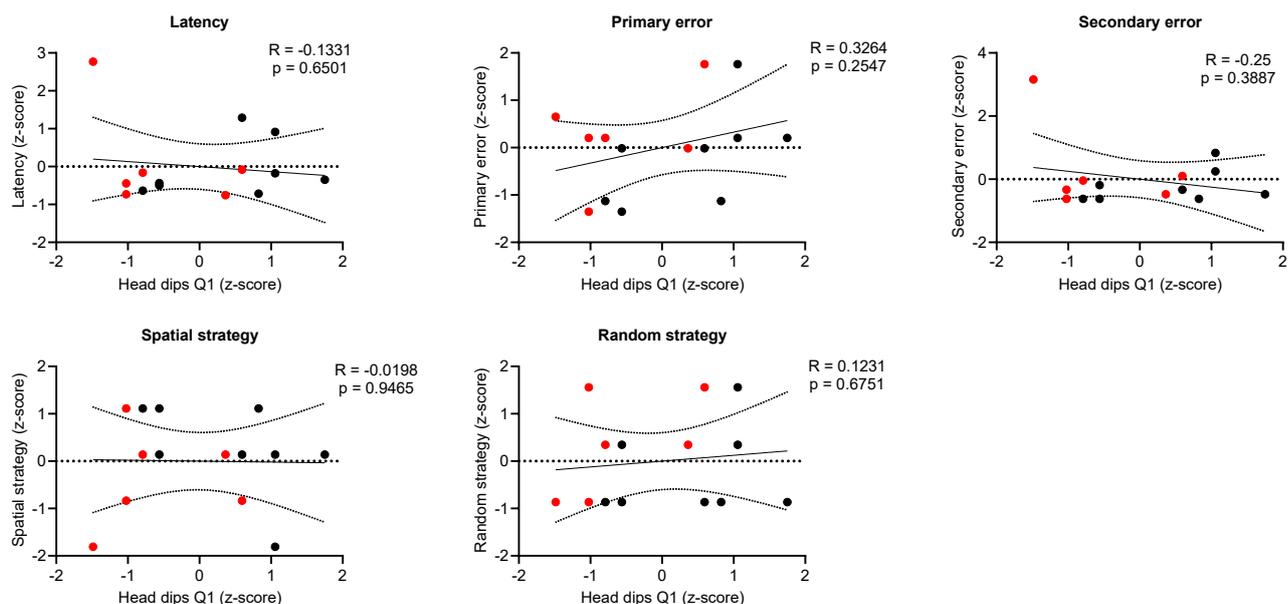


Fonte: elaborada pelo autor.

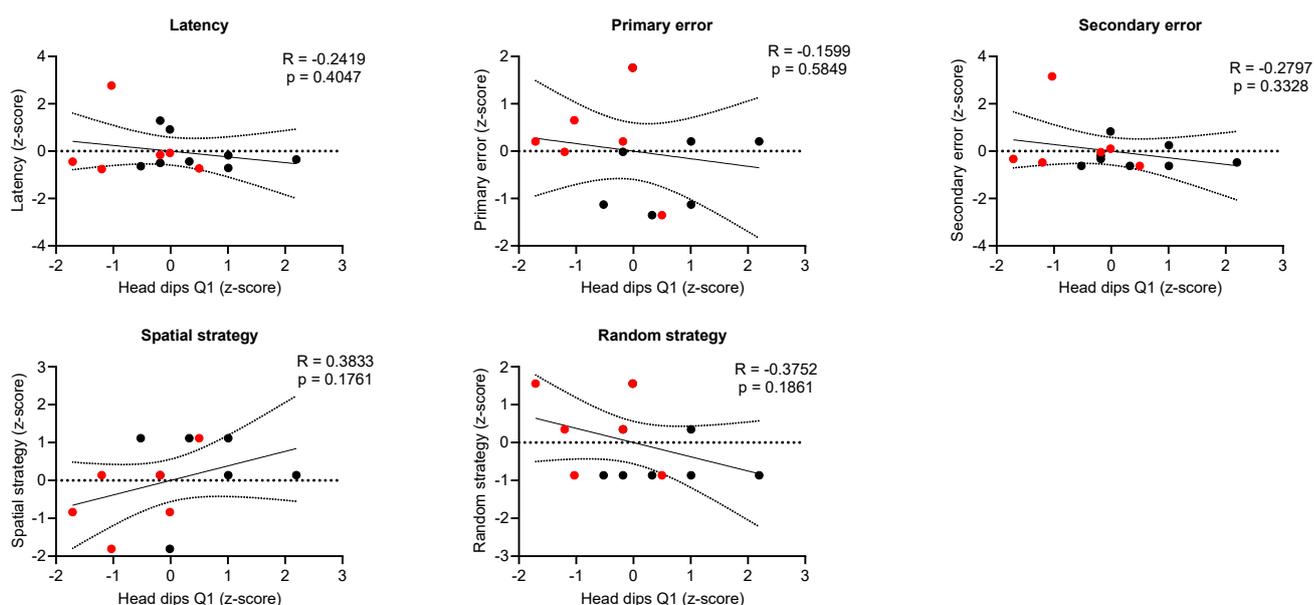
## APÊNDICE B - Figura 39

Figura 39 – Correlação entre indicadores de desempenho da aquisição (D4) e o número de visitas a buracos do quadrante-alvo na etapa de teste (D16). Pontos pretos: animais controle; pontos vermelhos: animais perturbação de *ripples*. As retas contínuas correspondem a um modelo de regressão linear dos dados e as curvas pontilhadas indicam o erro.

### Acquisition D4 vs head dipo in the target quadrante D16 (entire probe trial)



### Acquisition D4 vs head dipo in the target quadrant D16 (first 30 sec. of the probe)



Fonte: elaborada pelo autor.