

HINDIAEL AERAF BELCHIOR

**NEUROFISIOLOGIA HIPOCAMPAL DURANTE SESSÕES DE SONO
INTERCALADAS POR EXPLORAÇÃO ESPACIAL:
REVERBERAÇÃO DO PASSADO OU PREDIÇÃO DO FUTURO?**

Natal

2009

HINDIAEL AERAF BELCHIOR

NEUROFISIOLOGIA HIPOCAMPAL DURANTE SESSÕES DE SONO
INTERCALADAS POR EXPLORAÇÃO ESPACIAL:
REVERBERAÇÃO DO PASSADO OU PREDIÇÃO DO FUTURO?

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte, para a obtenção do título de Mestre em Psicobiologia.

Orientador: Sidarta Ribeiro

Natal
2009

Título: Neurofisiologia hipocampal durante sessões de sono intercaladas por exploração espacial: Reverberação do passado ou predição do futuro?

Autor: Hindiael Aeraf Belchior

Data da defesa: 17/04/2009

Banca examinadora:

Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. John Fontenele Araujo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dedico este trabalho à minha mãe.

"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton

Agradeço imensamente todos aqueles que contribuíram para a construção desse sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	02
ABSTRACT	04
I – INTRODUÇÃO	06
II – OBJETIVOS	13
III – MÉTODOS	14
IV – RESULTADOS	31
V – DISCUSSÃO	52
VI – CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Foto do animal 01.	15
Figura 02 – Foto do labirinto em cruz.	16
Figura 03 – Delineamento experimental.	17
Figura 04 – Sistema de registro eletrofisiológico.	18
Figura 05 – Software de aquisição (RASPUTIN).	19
Figura 06 – Estabilidade das formas de onda.	20
Figura 07 – Imagem gravada em vídeo.	21
Figura 08 – Histologia.	23
Figura 09 – Espaço-de-estados bi-dimensional.	24
Figura 10 – Hipnograma de estados.	25
Figura 11 – Espectro de potência do período de exposição aos braços.	26
Figura 12 – Seleção de neurônios representativos por taxa de disparo.	27
Figura 13 – Seleção de neurônios representativos por sincronia entre pares.	27
Figura 14 – Análise da similaridade de padrões populacionais.	29
Figura 15 – Porcentagem de acertos em cada braço.	31
Figura 16 – Tentativas necessárias para atingir o critério.	31
Figura 17 – Latência para entrada nos braços.	32
Figura 18 – Média e EPM do número de neurônios representativos selecionados por taxa de disparo compondo cada subgrupo.	33
Figura 19 – Média e EPM do número de neurônios representativos selecionados por sincronia entre pares compondo cada subgrupo.	34
Figura 20 – Média e EPM da taxa de disparo da população de neurônios nas cinco sessões de sono, para cada animal e a média dos animais.	35
Figura 21 – Média e EPM da taxa de disparo dos subgrupos de neurônios selecionados por taxa de disparo em cada sessão de sono, média dos animais.	36
Figura 22 – Média e EPM da taxa de disparo de cada subgrupo de neurônios selecionados por taxa de disparo nas cinco sessões de sono, média dos animais.	36
Figura 23 – Média e EPM da taxa de disparo dos subgrupos de neurônios selecionados por sincronia entre pares em cada sessão de sono.	37
Figura 24 – Média e EPM da taxa de disparo de cada subgrupo de neurônios selecionados por sincronia entre pares nas cinco sessões de sono.	38
Figura 25 – Comparação das médias das correlações usando toda a população de neurônios, subgrupos selecionados por taxa de disparo, e subgrupos selecionados por sincronia entre pares.	39
Figura 26 – Similaridade do animal 01.	40
Figura 27 – Correlações das sessões de sono PRE e POS braço alvo, animal 01.	40
Figura 28 – Similaridade do animal 02.	41
Figura 29 – Correlações das sessões de sono PRE e POS braço alvo, animal 02.	41
Figura 30 – Similaridade do animal 03.	42
Figura 31 – Correlações das sessões de sono PRE e POS braço alvo, animal 03.	42
Figura 32 – Similaridade média dos animais.	43
Figura 33 – Correlações das sessões de sono PRE e POS braço alvo, média dos animais.	44
Figura 34 – Similaridade dos neurônios representativos N, média dos animais.	44

Figura 35 – Similaridade dos neurônios representativos L, média dos animais.	45
Figura 36 – Similaridade dos neurônios representativos S, média dos animais.	46
Figura 37 – Similaridade dos neurônios representativos O, média dos animais.	47
Figura 38 – Correlações das sessões de sono PRE e POS braço alvo usando neurônios selecionados por taxa de disparo, média dos animais.	47
Figura 39 – Similaridade dos neurônios representativos N, média dos animais.	48
Figura 40 – Similaridade dos neurônios representativos L, média dos animais.	49
Figura 41 – Similaridade dos neurônios representativos S, média dos animais.	50
Figura 42 – Similaridade dos neurônios representativos O, média dos animais.	50
Figura 43 – Correlações das sessões de sono PRE e POS braço alvo usando neurônios selecionados por taxa de disparo, média dos animais.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

SOL	Sono de ondas lentas
REM	<i>Rapid eye movements</i> , expressão inglesa para 'movimento rápido dos olhos'
CA1	Cornu Ammonis 1
CA3	Cornu Ammonis 3
AP	Anteroposterior
ML	Médiolateral
DV	Dorsoventral
MAP	<i>Multichannel Acquisition Processor</i> , 'processador para aquisição de multicanais'
PCA	<i>Principal Component analysis</i> , 'análise de componente principal'
EPM	Erro padrão da média
DPE	Densidade de potência espectral
PRE	Sessão de sono antes da tarefa
POS	Sessão de sono após a tarefa

RESUMO

A capacidade de prever ameaças ou recompensas futuras é crucial para a sobrevivência. Estudos recentes têm investigado a predição de eventos futuros pelo hipocampo. Neurônios hipocâmpais exibem robusta seletividade para localização do animal no espaço. Assim, a atividade desses neurônios representa um mapa cognitivo do espaço durante a navegação e também durante o planejamento ou retrospectiva de navegação. Tal seletividade permite o envolvimento do hipocampo na formação de memórias espaciais e episódicas, incluindo o ordenamento de eventos sequenciais. Por outro lado, a descoberta de atividade reverberante em múltiplas áreas cerebrais durante os sonos de ondas lentas e REM revela o papel do sono na consolidação de traços de memória recém adquiridos na vigília. Até o momento, não há estudos investigando se a atividade de neurônios hipocâmpais durante o sono pode prever mudanças ambientais regulares. O objetivo deste estudo foi analisar a atividade de populações de neurônios hipocâmpais durante sessões de sono intercaladas por exploração espacial, em que a localização da recompensa muda de forma previsível a cada bloco da tarefa. Para isso, realizamos o implante crônico de uma matriz de 32 eletrodos na região de CA1 do hipocampo em três ratos machos da linhagem Wistar. Com a intenção de induzir a atividade de diferentes subgrupos de neurônios a cada ciclo de tarefa, submetemos os animais a quatro blocos de exploração espacial de um labirinto em cruz em que a recompensa era oferecida apenas em um braço a cada bloco. A localização da recompensa mudava a cada bloco, percorrendo todos os braços ao final da sessão diária. Os animais foram registrados por 2-12 dias consecutivos. Durante a exploração do labirinto em cruz, 67,5% dos neurônios registrados apresentaram diferenças de taxas de disparo entre os quatro braços do labirinto. Além disso, em média, 42% dos neurônios apresentaram grau elevado de sincronia entre pares neuronais ($R > 0,3$) em cada braço. Isso nos permitiu selecionar subgrupos de neurônios representativos para cada braço do labirinto e analisar a atividade desses subgrupos durante as sessões de sono. Observamos que os subgrupos de neurônios selecionados por diferenças na taxa de disparo durante exploração dos braços mantêm as taxas de disparo diferenciadas nas sessões de sono. O mesmo não ocorre para subgrupos selecionados por sincronia. Além disso, os níveis de similaridade das sessões de sono com os padrões de cada braço foram maiores usando toda a população de neurônios, do que usando subpopulações selecionadas por taxa ou sincronia. A atividade da população, ou de subpopulações, de neurônios hipocâmpais durante as sessões de sono não apresentou similaridade diferente entre os quatro braços

do labirinto em cruz. Entretanto, verificamos que as sessões de sono pré-exploração apresentam maiores níveis de similaridade com a atividade do braço alvo do que as sessões de sono pós-exploração. Ou seja, a atividade neural do sono que antecede a tarefa reflete mais fortemente a localização da recompensa do que a atividade do sono subsequente a tarefa. Nossos resultados sugerem que a atividade neural durante o sono pode prever mudanças ambientais regulares.

ABSTRACT

The ability to predict future rewards or threats is crucial for survival. Recent studies have addressed future event prediction by the hippocampus. Hippocampal neurons exhibit robust selectivity for spatial location. Thus, the activity of hippocampal neurons represents a cognitive map of space during navigation as well as during planning and recall. Spatial selectivity allows the hippocampus to be involved in the formation of spatial and episodic memories, including the sequential ordering of events. On the other hand, the discovery of reverberatory activity in multiple forebrain areas during slow wave and REM sleep underscored the role of sleep on the consolidation of recently acquired memory traces. To this date, there are no studies addressing whether neuronal activity in the hippocampus during sleep can predict regular environmental shifts. The aim of the present study was to investigate the activity of neuronal populations in the hippocampus during sleep sessions intercalated by spatial exploration periods, in which the location of reward changed in a predictable way. To this end, we performed the chronic implantation of 32-channel multielectrode arrays in the CA1 regions of the hippocampus in three male rats of the Wistar strain. In order to activate different neuronal subgroups at each cycle of the task, we exposed the animals to four spatial exploration sessions in a 4-arm elevated maze in which reward was delivered in a single arm per session. Reward location changed regularly at every session in a clockwise manner, traversing all the arms at the end of the daily recordings. Animals were recorded from 2-12 consecutive days. During spatial exploration of the 4-arm elevated maze, 67,5% of the recorded neurons showed firing rate differences across the maze arms. Furthermore, an average of 42% of the neurons showed increased correlation ($R > 0.3$) between neuronal pairs in each arm. This allowed us to sort representative neuronal subgroups for each maze arm, and to analyze the activity of these subgroups across sleep sessions. We found that neuronal subgroups sorted by firing rate differences during spatial exploration sustained these differences across sleep sessions. This was not the case with neuronal subgroups sorted according to synchrony (correlation). In addition, the correlation levels between sleep sessions and waking patterns sampled in each arm were larger for the entire population of neurons than for the rate or synchrony subgroups. Neuronal activity during sleep of the entire neuronal population or subgroups did not show different correlations among the four arm mazes. On the other hand, we verified that neuronal activity during pre-exploration sleep sessions was significantly more similar to the activity patterns of the target arm than neuronal activity during pre-exploration sleep sessions. In other words, neuronal activity during sleep that

precedes the task reflects more strongly the location of reward than neuronal activity during sleep that follows the task. Our results suggest that neuronal activity during sleep can predict regular environmental changes.

INTRODUÇÃO

A função adaptativa do sono é um dos grandes mistérios do cérebro que começa a ser explorado pela ciência cognitiva moderna. Apesar de se tratar de um fenômeno biológico largamente difundido entre os vertebrados, até a metade do século 20 o sono era visto como um período de pouca ou nenhuma atividade cerebral, onde o bloqueio de entrada sensorial e de comportamentos motores, a perda de consciência e a carência de memórias associadas, características desse estado, pareciam dar suporte a essa conclusão. Muitos avanços na compreensão dos mecanismos reguladores do ciclo sono-vigília foram alcançados nas últimas décadas [1], e o sono é hoje entendido como um período de atividade cerebral dinâmica, composto principalmente por dois estágios complementares: o sono de ondas lentas (SOL) e o sono de rápido movimento dos olhos (*REM*, do inglês *Rapid Eye Movement*). Além da manutenção da saúde psíquica, imunológica e da homeostase geral, têm sido creditadas ao sono diferentes funções mnemônicas [2, 3]. Contudo, o papel adaptativo do sono ainda hoje aguarda esclarecimentos. Como pode a atividade neural gerada durante o sono, na predominante ausência de estímulos sensoriais e comportamentos motores, favorecer o comportamento dos animais durante a vigília?

Múltiplas linhas de evidência demonstram o papel do sono na consolidação de novas memórias. O estudo pioneiro de Jenkins & Dallenbach em seres humanos mostrou que o esquecimento gradual de novas memórias é atenuado pelo sono [4], sendo a retenção de memórias maior quando o aprendizado é seguido de um período de sono do que da mesma quantidade de tempo em vigília. A partir do final da década de 1960, experimentos de privação de sono [5-7] e de inibição de síntese protéica durante o sono [8] em roedores corroboraram esse achado original. Vários estudos têm mostrado que o sono é importante para a consolidação de memórias episódicas e memórias de

procedimentos [9-11]. Além disso, o aprendizado dependente de *insight*, em que memórias precisam ser reestruturadas em vez de reforçadas, também parece ser facilitado pelo sono [12]. Ainda assim, não se sabe como as experiências da vigília provocam atividade neural durante o sono capaz de reestruturar o comportamento dos animais em experiências futuras.

Para a plena compreensão do papel mnemônico do sono, é preciso esclarecer de que forma a atividade neural gerada durante o sono fornece uma janela apropriada para o aprendizado. A hipótese que vincula o sono à deflagração de plasticidade neural se apóia em evidências eletrofisiológicas e moleculares [13]. No que diz respeito às evidências eletrofisiológicas, vários grupos incluindo o nosso têm mostrado que circuitos neuronais ativados durante a experiência do indivíduo em vigília são fortemente reativados durante o sono subsequente, fornecendo evidências empíricas que relacionam a consolidação de memórias à reativação de populações neuronais durante o sono de ondas lentas e o sono *REM* [14-20]. Por outro lado, estudos moleculares do ciclo sono-vigília indicam que o sono *REM* aumenta a expressão de fatores de transcrição diretamente implicados com a plasticidade neural [17, 21-24].

Com base no conjunto de evidências disponíveis, Ribeiro & Nicolelis [13] propuseram que os dois principais estágios de sono, SOL e *REM*, têm funções complementares sobre a consolidação de novas memórias: a reverberação no SOL dos circuitos previamente ativados durante a vigília; e a transcrição de genes relacionados a plasticidade, e conseqüente rearranjo estrutural desses circuitos durante o sono *REM*.

Dentre as estruturas com papel mnemônico, o hipocampo é uma estrutura cerebral essencial para a formação de novas memórias episódicas (lugares, fatos e eventos). Sem a formação hipocampal, memórias episódicas de longo prazo não são formadas [25-29]. Acredita-se que a consolidação de memórias de longo prazo envolva a redistribuição dos novos traços de memória, que migram das estruturas hipocampais utilizadas para

armazenamento temporário, para estruturas neocorticais apropriadas ao armazenamento permanente (“memórias hipocampo-dependentes”). Dessa forma, tem sido sugerido que o hipocampo codifica e armazena temporariamente novas informações durante a vigília, e promove o armazenamento mnemônico definitivo em circuitos corticais ao reativar traços de memória durante o sono [16, 25].

Um importante papel mnemônico do hipocampo está relacionado à geração de um mapa cognitivo do espaço em humanos e outros animais [26, 30]. Neurônios piramidais da região CA1 (e outras regiões) da formação hipocampal exibem seletividade para a localização do animal no espaço, disparando rajadas de potenciais de ação em alta frequência quando o animal se posiciona em determinado lugar do ambiente. Esses neurônios foram denominados “células espaciais” e seus campos receptivos foram chamados campos espaciais por O’Keefe & Dostrovsky em 1971 [30]. Assim como a atividade de neurônios isolados, o potencial de campo¹ no hipocampo de roedores também reflete comportamentos de navegação espacial através do ritmo teta (5-10 Hz), que ocorre principalmente em duas situações: exploração ativa do ambiente e durante o sono REM. Potenciais de ação e de campo estão relacionados, ocorrendo uma precessão de fase (os potenciais de ação se adiantam em relação à fase da onda do ciclo teta) à medida que o animal atravessa um campo espacial durante a navegação [31].

Desde então, diversas observações têm iluminado a função do hipocampo na formação de um mapa espacial. Estima-se que 30-50% das células piramidais de CA1 no hipocampo dorsal apresentem atividade local-dependente [32, 33]. Com padrões de atividade neural fortemente correlacionados com a posição do rato no espaço, o hipocampo provê uma representação espacial relativamente estável ao longo de sucessivas exposições à um mesmo ambiente [34]. Entretanto, são ativados subgrupos

¹ O potencial de campo local fornece informação sobre o funcionamento geral de uma região. É uma medida da atividade sincronizada de populações de neurônios e, provavelmente, inclui a contribuição de potenciais de ação, dos potenciais dendríticos e gliais lentos, e principalmente dos potenciais sinápticos excitatórios e inibitórios.

diferentes de células espaciais (sobrepostos ou totalmente independentes; fenômeno denominado “remapeamento”) quando ocorrem mudanças ambientais consistentes, como alterações no formato do campo aberto ou na disposição de dicas espaciais [34, 35].

Somados às claras evidências da existência de células espaciais estritas, estudos populacionais sugerem que a atividade coordenada de agrupamentos de neurônios anatomicamente distribuídos sustenta o processamento de informações espaciais no hipocampo (“hipótese de agrupamentos neuronais”) [32, 36]. Registros em larga escala têm tornado possível reconstruir a posição do animal no ambiente a partir apenas dos padrões de disparo de populações de células espaciais [37]. Esses estudos têm mostrado que maior acurácia de informação espacial está disponível quando a atividade de grupos de neurônios hipocampais é analisada. Segundo Harris [36] e outros autores, a organização em agrupamentos de neurônios cooperativos otimiza a propagação e o armazenamento de informações em circuitos corticais [15, 36, 38].

Contudo, recentemente têm sido mostrado que células hipocampais podem apresentar atividade relacionada a outras posições do espaço que não a localização corrente do animal. Pastalkova e cols [19] reportaram que nos intervalos de uma tarefa de alternância de trajetórias em um labirinto em forma de 8 populações de células hipocampais (CA1) disparam na mesma sequência ativada durante a realização da tarefa de navegação espacial. Os autores mostraram que informação preditiva sobre a escolha comportamental do animal (tanto para os acertos como para os erros) está disponível na sequência de células hipocampais ativada durante os intervalos de cada tentativa. Tais sequências de disparo internamente geradas não ocorrem em tarefas não mnemônicas. Os autores sugerem que as sequências de disparo são geradas internamente por mecanismos auto-organizados, flexíveis (facilmente perturbado e atualizado), e que pode suportar a evocação de eventos passados e o planejamento de ações futuras.

Outros estudos têm reportado o envolvimento das subregiões CA1 e CA3 do

hipocampo de roedores em tarefas prospectivas. Ao registrar neurônios da região CA1 enquanto ratos exploravam um labirinto em forma de duplo Y, Ainge e cols. [39] puderam dissociar a atividade relacionada à posição corrente, da atividade relacionada à intenção de destino do animal, e assim prever as escolhas de trajetória no labirinto. Investigando tomada de decisões, Johnson & Redish [40] mostraram que a atividade de neurônios da região CA3 pode indicar o caminho subseqüentemente percorrido por ratos. As células de CA3 que representam o braço escolhido disparam quando os ratos ainda estão no ponto de decisão de um labirinto em T. Segundo os autores, esse tipo de atividade é influenciado pela demanda da tarefa e pelas experiências prévias do animal [40].

Paralelamente, estudos em humanos têm corroborado esses achados ao examinar a atividade hipocampal durante tarefas de evocação e predição de eventos ou prospecção [41]. Gelbard-Sagiv e cols. [42] registraram a atividade de neurônios hipocampais isolados em humanos e observaram que subgrupos de neurônios apresentam atividade seletiva enquanto os sujeitos visualizam determinadas cenas de vídeos. E que durante evocação, as mesmas células são reativadas antecipadamente ao relato verbal da cena previamente assistida.

Dois estudos utilizando imageamento por ressonância magnética funcional examinaram as estruturas encefálicas envolvidas em experiências subjetivas de deslocamento no tempo (“viagem mental no tempo”) [43, 44]. Interessantemente, ambos encontraram que a imaginação de eventos futuros recruta o mesmo substrato neural necessário para lembrar o passado. Para tal, contribuem principalmente o lobo temporal medial e o córtex prefrontal medial, provavelmente, devido à integração de eventos já vivenciados àqueles projetados futuramente.

Ressaltando ainda mais a importância de estruturas com reconhecidas funções mnemônicas para a prospecção, Hassabis e cols. [45] verificaram que pacientes amnésicos com danos no hipocampo também apresentam profundos déficits na

capacidade de imaginar novas experiências a partir de dicas verbais.

A prospecção faz com que o indivíduo prepare respostas comportamentais adequadas, com consequências futuras benéficas, ou rearranjos comportamentais em caso de erros. Desta forma, baseados na regularidade estatística de experiências e eventos anteriores, humanos e outros animais podem prever características de situações futuras, tais como localização espacial, relações temporais e magnitude de recompensa, otimizando seu comportamento [46, 47]. Nesse sentido, a aquisição de memórias corresponde a um aumento do repertório de experiências vividas disponíveis num banco de dados usado para decisões e comportamentos futuros.

Tal seletividade para o processamento de informações contextuais (mnemônicas e espaciais) permite o estudo do envolvimento do hipocampo na formação de memórias espaciais e episódicas, incluindo um papel crítico no ordenamento temporal de eventos sequenciais, tanto em humanos quanto em outros animais [48-50].

Pavlides & Winson [14], valendo-se da codificação espacial do hipocampo, foram pioneiros no estudo do papel mnemônico da reativação neuronal durante o sono. Ao investigar, em ratos, a taxa de atividade de neurônios hipocampais durante exploração do ambiente e estágios de sono subsequentes, Pavlides & Winson verificaram que apenas as células espaciais intensamente ativadas na experiência apresentavam taxa de disparo persistentemente aumentada durante as fases de sono subsequentes.

O estudo de populações de neurônios hipocampais tem confirmado e expandido as evidências da existência de padrões de reatividade neuronal durante sessões de sono subsequentes a tarefa. Wilson & McNaughton [15] analisaram a sincronia de atividade entre todos os possíveis pares neuronais de uma população registrada e verificaram que interações recém-adquiridas ou acentuadas durante uma nova experiência se mantêm fortalecidas durante o sono de ondas lentas subsequente. Isso sugere que os traços de memória adquiridos em novas experiências durante a vigília são reativados durante o

sono seguinte.

A reativação de circuitos neuronais preserva os padrões temporais exibidos durante a realização da tarefa, e ocorre coordenadamente dentro de grupos celulares locais e também entre grupos situados em diferentes estruturas encefálicas, tanto durante o sono [18, 38, 49, 51, 52], como durante a vigília [19, 53]. Padrões de reativação estruturados em ordem reversa [54] e temporalmente comprimidos [55] também foram encontrados. Entretanto, além de importantes críticas metodológicas, outros experimentos não replicaram esses achados [16].

Em conjunto, estes estudos mostram que os circuitos hipocampais estão envolvidos no reprocessamento de eventos passados, assim como no planejamento e na simulação de eventos futuros. Apesar das evidências de reativação de padrões de atividade relacionados a eventos passados, a codificação do futuro por neurônios hipocampais durante o sono ainda não foi demonstrada. Para abordar esta questão, o presente estudo investigou a hipótese de que a atividade de neurônios hipocampais durante os sonos pré e pós-experiência pode refletir a localização de recompensas em uma tarefa espacial. Podem mudanças ambientais regulares provocar reativação neural durante o sono de forma a preparar o animal para possíveis eventos futuros?

OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar a atividade de populações de neurônios hipocâmpais durante sessões de sono intercaladas por tarefa espacial regularmente modificada.

Objetivos específicos

- 1) Investigar a média da taxa de disparo de populações de neurônios durante sessões de sono.
- 2) Correlacionar padrões de atividade associados aos braços do labirinto com os padrões de atividade das sessões de sono.
- 3) Formar subgrupos de neurônios representativos para cada braço do labirinto durante a vigília, e verificar os parâmetros acima citados.
- 4) Verificar se a atividade neural dos sonos pré e pós-exploração refletem as mudanças comportamentais exigidas pela tarefa espacial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Três ratos machos adultos (300-350g) da linhagem Wistar foram utilizados nesse experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob ciclo claro-escuro de 12 horas (07 às 19 horas) e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo, entre 09 e 16 horas.

Neurocirurgia para implante de eletrodos

Cada animal foi submetido a uma cirurgia estereotáxica para o implante permanente de uma matriz de 32 microeletrodos (de configuração 4x8). Para tal, os animais foram retirados do biotério e colocados numa câmara gasosa contendo o anestésico Isoflurano diluído numa concentração de 5% em oxigênio. Após a sedação gasosa, foram administrados sulfato de atropina na dose de 0,04 mg/Kg, cetamina na dose de 100,0 mg/Kg e xilazina na dose de 8,0 mg/Kg (todos com aplicação intramuscular). No decorrer da cirurgia, a profundidade da anestesia foi periodicamente verificada com teste de pinçamento da pata e doses suplementares de cetamina (metade da dose inicial) foram administradas quando necessário.

Após tricotomia e assepsia do campo cirúrgico com solução de iodo povidine, o animal foi posicionado em um aparelho estereotáxico. Epinefrina (associada a lidocaína) foi injetada no tecido subcutâneo onde foi realizada uma incisão longitudinal, expondo o crânio que foi raspado e tratado com água oxigenada. O centro e os quatro pontos marginais da craniotomia foram marcados segundo as dimensões da matriz de eletrodos e segundo as coordenadas estereotáxicas da região CA1 do hipocampo (AP: -2,80; ML: +1,5; DV: 2,40, de acordo com Paxinos & Watson [56]).

Brocas dentais de diâmetro apropriado foram utilizadas para a realização da

craniotomia de uma janela retangular, e das quatro pequenas perfurações para inserção dos parafusos de sustentação e aterramento. Houve cuidado para que o parafuso de aterramento estivesse em contato com o líquido céfalo-raquidiano, a fim de prover aterramento elétrico aos eletrodos. O fio de referência da matriz de eletrodos foi soldado ao parafuso de aterramento enquanto uma pinça metálica dissipava o calor da solda, evitando o superaquecimento das partes metálicas em contato com o animal.

Após craniotomia da janela, a dura-máter foi retirada cuidadosamente com uma ponta de agulha retorcida, expondo o córtex cerebral e permitindo a penetração da matriz de eletrodos. Para boa acomodação dos eletrodos no tecido cerebral a penetração foi realizada lentamente (100 micrômetros a cada 5 minutos). Acrílico dental polimerizável foi usado para confeccionar um capacete sobre o crânio, dando sustentação e estabilizando a posição final dos eletrodos.

Após a cirurgia, os animais receberam antibiótico Fluotril (intramuscular) na dose de 2,5 mg/Kg, 30 gotas do analgésico Tylenol diluídas em 250 ml de água, e permaneceram por uma semana em observação/recuperação.



Fig. 01 – Foto do animal 01. Sete dias após cirurgia de implante.

Preparação e habituação dos animais

Próximo ao período experimental, os animais foram submetidos a uma dieta de restrição protéico-calórica para mantê-los a aproximadamente 90% de seu peso inicial. Durante esse período (5-7 dias), os animais foram pesados, manipulados diariamente por 10 minutos e familiarizados com o ambiente do experimento, com o cereal Nescau usado como recompensa, e com a caixa de dormir (feita de material plástico opaco com dimensões de 30 cm de altura, 30 cm de largura e 45 cm de comprimento).

Aparato de aprendizagem espacial: Labirinto em cruz

O protocolo comportamental foi realizado em sala a 19°C, devidamente iluminada e enriquecida com dicas espaciais posicionadas a um metro do labirinto utilizado para a tarefa de memória espacial. O labirinto em cruz foi feito de madeira pintada de preto; com seguintes medidas: 75 cm de elevação do piso, braços de 50 cm de comprimento e 15 cm de largura, com área central de 225 cm² e paredes de 10 cm de altura devidamente sinalizadas com figuras geométricas específicas no final de cada braço. Pontos cardeais foram usados na nomenclatura dos braços para ilustrar as relações espaciais entre eles, mas não há correspondência entre as posições espaciais e os pontos cardeais geográficos.

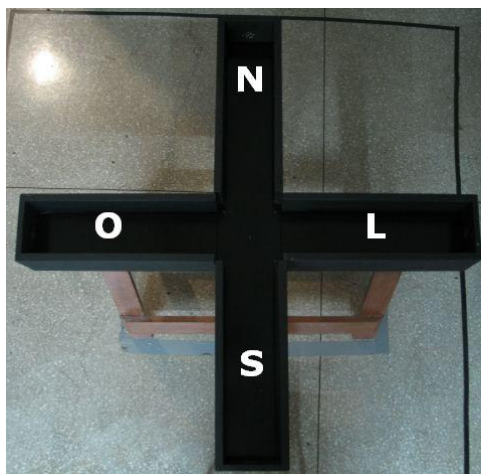


Fig. 02 – Foto do labirinto em cruz.

Delineamento experimental

Cinco sessões de sono alternadas por quatro blocos de tarefa espacial foram registradas continuamente. A cada ciclo sono-vigília a localização da recompensa era alterada de maneira regular, percorrendo os quatro braços do labirinto conforme a seguinte sequência:

[sono 1 - tarefa N - sono 2 - tarefa L - sono 3 - tarefa S - sono 4 - tarefa O - sono 5]



Figura 03 – Delineamento experimental. As imagens do labirinto indicam o braço percorrido a cada bloco.

Após permanecerem na caixa de dormir por 30-45 minutos, os ratos foram colocados na área central do labirinto em cruz. Permaneceram contidos por cerca de 30 segundos até as paredes de contenção central serem retiradas, permitindo que os animais buscassem a recompensa. Os animais dispunham de 90 segundos para explorar livremente um braço a sua escolha, para então serem conduzidos e contidos novamente na área central do labirinto por mais trinta segundos até a próxima tentativa.

Na extremidade final do braço-alvo havia, como recompensa pela escolha correta, meio cereal 'Nescau'. Blocos de aproximadamente quinze tentativas foram feitos, sendo que na última tentativa apenas a porta do braço-alvo que continha a recompensa era aberta, configurando um aprendizado induzido. Os animais eram então retirados do labirinto e recolocados na caixa de dormir, onde permaneciam por 30 minutos resguardados de estimulação até o momento de retorno ao labirinto.

A cada bloco de tentativas, a recompensa foi posicionada no braço seguinte de forma sequencialmente ordenada (sentido horário). Quatro blocos da tarefa espacial

foram realizados diariamente, percorrendo os quatro braços do labirinto. A conclusão do último ciclo terminava com um período de sono na caixa de dormir, após o qual os animais retornavam ao biotério.

O animal 01 foi treinado por 12 dias consecutivos, os animais 02 e 03 foram treinados por 9 dias consecutivos.

Aquisição de dados eletroencefalográficos e comportamentais

Para aquisição, discriminação e armazenamento dos sinais neuronais, foi usado um computador equipado com o sistema de aquisição de sinal multineuronal de 32 canais (*Multichannel Acquisition Processor (MAP)*, Plexon Inc.) associado a uma matriz de 32 microeletrodos de tungstênio com diâmetro de 35 micrômetros, isolados por teflon, e dispostos com espaçamento de 500 micrômetros (impedância de 1.0MΩ a 1KHz). Esta ferramenta permite que a atividade de até 128 neurônios individuais e 16 potenciais de campo local sejam registrados enquanto os animais se comportam semi-livremente.



Sistema de aquisição MAP

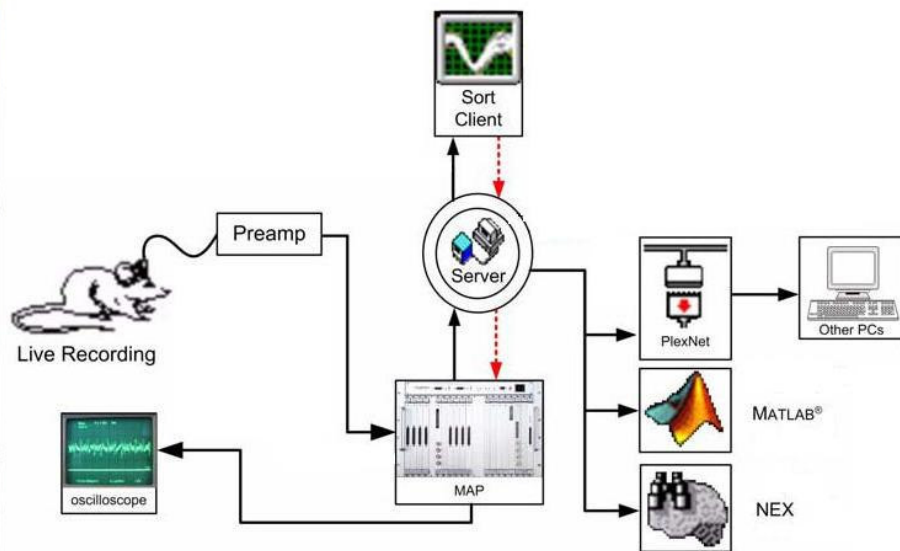


Fig. 04 – Sistema de registro eletrofisiológico. À esquerda, foto do sistema de registro; à direita, organização esquemática do sistema de aquisição MAP.

Após amplificação, os sinais são duplicados e submetidos a filtros nas faixas de banda baixa (0.7 – 300 Hz) e banda alta (0.15 – 8.8 KHz) para obtenção do potencial de campo local amostrado a 500 Hz, e do potencial de ação de neurônios individuais amostrado a 40 KHz, respectivamente. O sistema MAP coleta amostras das variações do potencial elétrico extracelular detectados pelos microeletrodos a cada 25 microsegundos, permitindo que as formas de onda dos potenciais de ação sejam reconstituídas. Em geral, neurônios individuais produzem variações elétricas estereotipadas e razoavelmente estacionárias. A discriminação entre neurônios é feita através de diferenças no envelope da forma de onda de cada potencial de ação, que se dão em função da distância eletrodo-neurônio, do tipo de neurônio, da morfologia do corpo celular e da posição geométrica relativa entre neurônio e eletrodo.

É possível registrar a atividade de até quatro neurônios independentes por eletrodo implantado, sendo a classificação dos potenciais de ação feita manualmente e em tempo real (*software SortClient, Plexon Inc.*) e a validação em análise *a posteriori* (*software Offline Sorter, Plexon Inc.*). Os parâmetros utilizados para classificar sinais neurais extracelulares como potenciais de ação são: limiar de voltagem, relação sinal-ruído, distribuição de intervalos entre potenciais de ação, estereotipia das formas de onda e período refratário do potencial de ação.

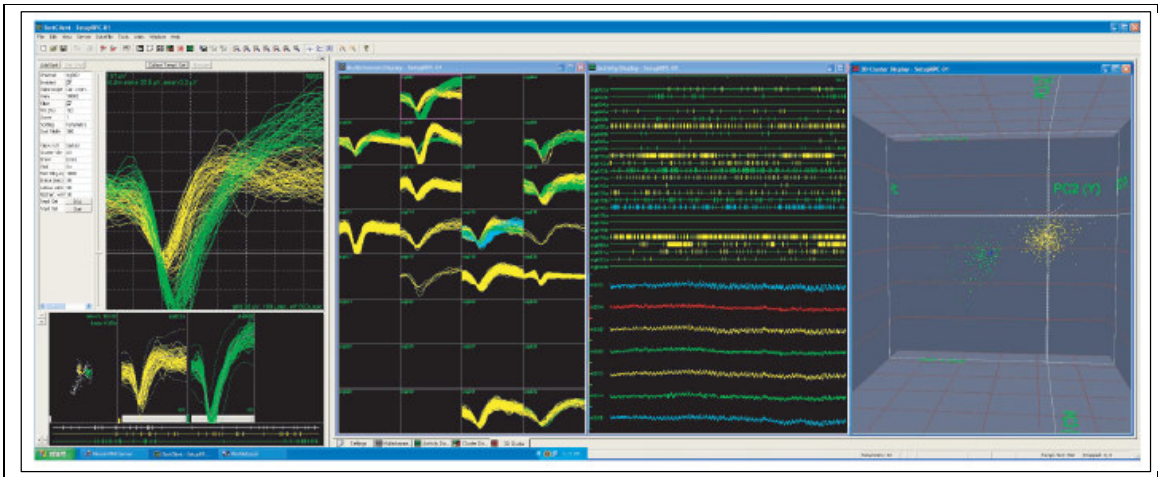


Fig 05 – Software de aquisição (*RASPUTIN*). Da esquerda para direita: canal de registro selecionado, onde formas de onda de dois neurônios são discriminadas; os 32 canais de registro; potenciais de ação e de campo local registrados; análise de componente principal em 3 dimensões das formas de onda do canal selecionado.

Estabilidade dos registros – Acompanhamento neuronal individualizado

Registros extracelulares de potenciais de ação estão sujeitos a não estacionariedade dos sinais com o passar do tempo, por microvariações das posições relativas de eletrodos e corpos celulares. Para registrar neurônios individuais continuamente por até 5 horas utilizamos um algoritmo adaptativo (*software SortClient 2002, Plexon Inc.*) que ajusta continuamente o envelope de formas de onda inicialmente definido às formas de onda coletadas a cada momento. Isso permite que a atividade de um mesmo neurônio seja acompanhada através de longos períodos consecutivos, ainda que haja modificações nas formas de onda do potencial de ação.

A consistência dos envelopes de formas de onda característicos de cada neurônio pode ser verificada através da sobreposição das formas de onda adquiridas ao longo de todo o experimento (*software Wavetracker, Plexon Inc.*).

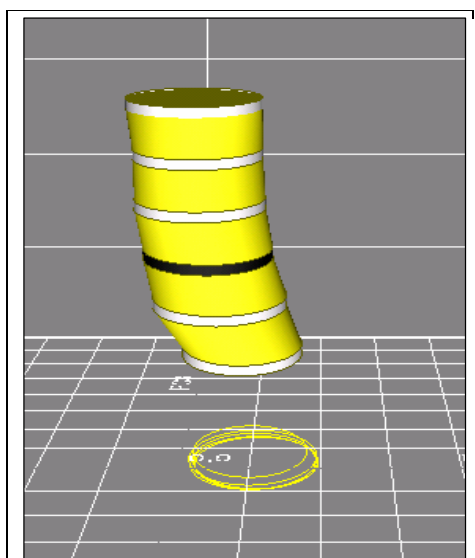


Fig. 06 – Estabilidade das formas de onda. Cada elipse (amarelo) representa as formas de onda registradas ao longo de uma sessão de sono, cinco sessões são empilhadas. O tempo é mostrado no eixo y , e os eixos x e z mostram análises de componente principal (PCA) das características morfológicas das formas de onda. A ausência de mudanças abruptas assegura a estabilidade do registro.

Análise comportamental

As análises comportamentais visam encontrar diferenças no padrão exploratório de cada braço, e para isso se baseiam na porcentagem de acertos em cada bloco de tentativas (N-L-S-O); no número de tentativas necessárias até que 7 das últimas 10 entradas em de cada bloco fossem corretas; e na latência dos animais para a escolha dos braços. A análise do comportamento a cada sessão nos permite correlacionar o desempenho de cada bloco de tentativas com a atividade neural dos sons prévio e subsequente.

Para comparar o comportamento dos animais entre os blocos da tarefa, os dados de desempenho foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas, e o nível de significância considerado foi $p < 0,05$. No caso de significância estatística, foi aplicado o teste *post hoc Tukey's Multiple Comparison Test* ($\alpha = 0,05$). Os

resultados comportamentais foram representados como média e erro padrão da média (EPM). Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism Software, version 4.0, www.graphpad.com*).

O comportamento foi monitorado em vídeo (formato *DVD*), e sincronizado com o registro da atividade eletroencefalográfica através do uso de um temporizador de alta precisão.

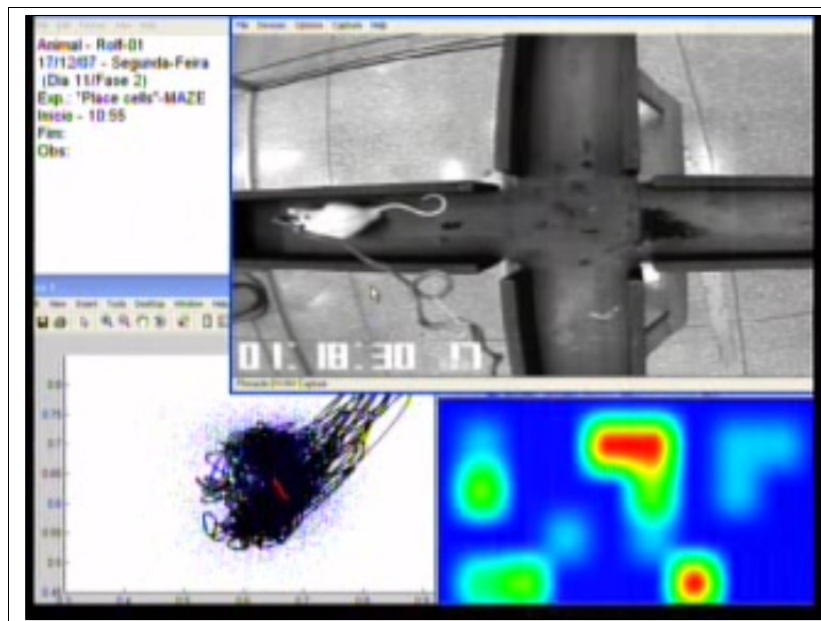


Fig 07 – Imagem gravada em vídeo. Acima, ficha de identificação do experimento e monitoramento em vídeo; abaixo, espaço-de-estados em tempo real e atividade registrada pela matriz de eletrodos codificada em cores.

Eutanásia por perfusão transcardíaca

Após sedação gasosa dada por isoflurano 5% e sobredose anestésica por tiopental sódico (1 ml), o rato é posicionado em decúbito ventral sobre mesa vazada e seus membros posteriores e anteriores são presos por elásticos. É feita, então, uma incisão abdominal para expor as vísceras. O intestino é rebatido, a aorta abdominal é exposta e clampada usando uma tesoura hemostática. A incisão é estendida até o tórax de maneira a expor o coração. Uma agulha ligada a um sistema de bombeamento é

introduzida no ventrículo esquerdo. Uma incisão é feita no ventrículo direito imediatamente antes de se ligar o sistema de bombeamento que fará circular 300 ml de solução salina heparinizada e aquecida, seguida de 300 ml de paraformaldeído (4%) em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Após craniotomia o cérebro é extraído, armazenado a 4°C por 24 horas em solução de tampão fosfato 0,1M, seguidas de 24 horas em em solução sacarose 20%. O cérebro foi então bloqueado e crioprotegido em meio de inclusão *Tissue Tek* por imersão do recipiente plástico em uma mistura de álcool absoluto e gelo seco, e conservados em refrigerador -80°C para processamento histológico posterior.

Histologia

Uma vez congelados, os cérebros dos animais foram cortados em secções coronais de 30 micrômetros de espessura (amostras coletadas a cada 90 micrômetros). Após montagem a seco sobre lâminas previamente gelatinizadas, as secções foram coradas por solução cresil violeta (reação de *Niessl*), visualizadas e fotografadas a um microscópio óptico para verificar o posicionamento da ponta dos eletrodos.

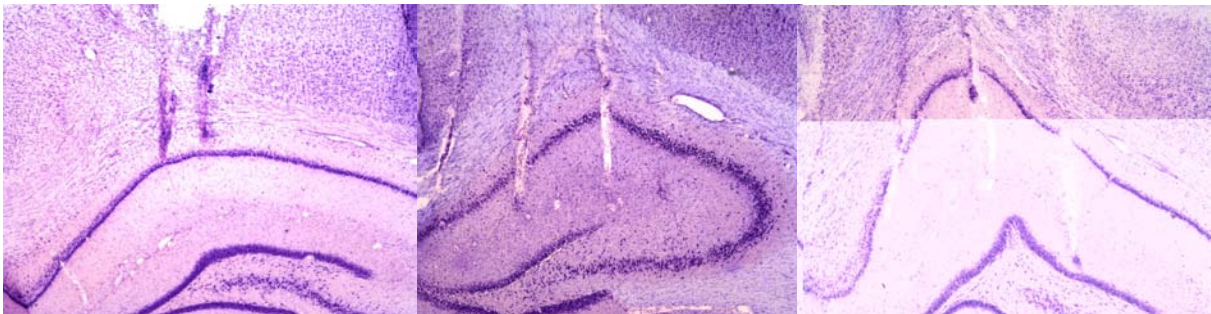


Figura 08 – Histologia. Secções coronais do hipocampo identificando o posicionamento dos eletrodos implantados (aumento de 10 vezes; animais 01, 02 e 03).

Processamento inicial dos dados eletrofisiológicos

Os registros de atividade neuronal de cada fase do protocolo experimental, como potencial de ação e potencial de campo local, foram convertidos em matrizes para serem

analisados em programa MATLAB[®]. Hipnogramas foram gerados e as matrizes de potencial de campo e de potenciais de ação foram concatenadas de acordo com o estado comportamental de interesse. Então, a taxa de disparo foi calculada para todos os neurônios em janelas de 250 milisegundos e normalizada para cada neurônio individualmente, a partir de sua taxa máxima.

Classificação dos estados comportamentais

Hipnogramas foram gerados através da classificação semi-automática dos estados comportamentais segundo método^{II} desenvolvido por Gervasoni e cols. [57]. A geração do espaço-de-estados também foi executada em tempo real, possibilitando o acompanhamento dos ciclos de sono durante a realização do protocolo experimental. A concatenação dos estados-alvo do hipnograma foi realizada para que as análises dos sonos *REM* e *SOL* pudessem ser realizadas separadamente.

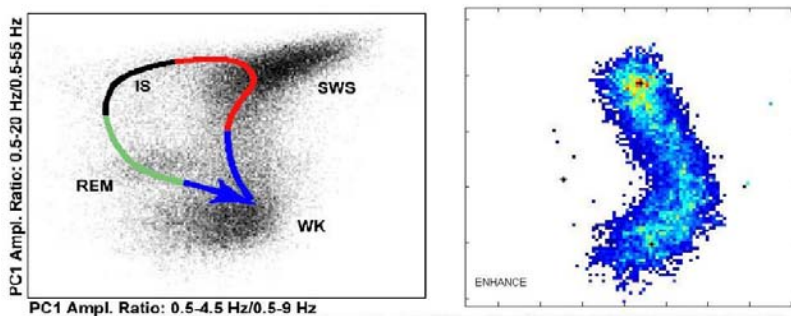


Fig. 09 – Espaço-de-estados bi-dimensional. Cada ponto representa um segundo de atividade cerebral, os agrupamento de pontos permitem a identificação dos estados comportamentais (à esquerda modelo e à direita gerado a partir do animal 01).

^{II} Brevemente, algoritmos matemáticos calculam a taxa de amplitude espectral do potencial de campo local em duas razões que permitem a separação objetiva de distintos agrupamentos projetados em um espaço-de-estados bi-dimensional: razão 1 – 0,5-20/0,5-55 Hz; razão 2 – 0,5-4,5/0,5-9 Hz.

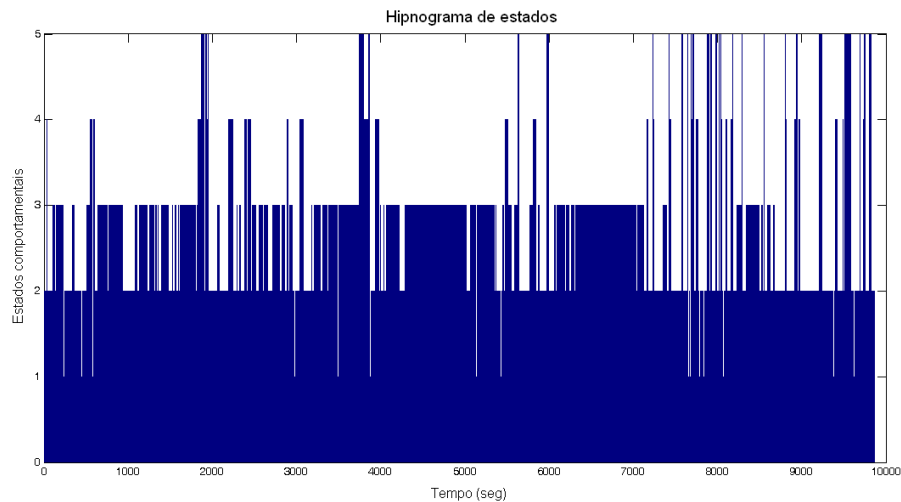


Fig. 10 – Hipnograma de estados. A atividade das cinco sessões de sono concatenadas é classificada de acordo com o estado comportamental. (1-estado não identificado; 2-vigília; 3-SOL ; 4-sono *REM*; 5-transição de estados)

ANÁLISE DA VIGÍLIA

Amostras do padrão de atividade de cada braço

Os animais foram colocados em cada braço do labirinto durante cinco a dez minutos diariamente. Períodos de exploração ativa^{III} foram selecionados e utilizados como ‘Modelos’ do padrão de atividade da população de células em cada braço (métrica de similaridade, descrita adiante), assim como para a formação de subgrupos de neurônios representativos para cada braço.

^{III}Definimos como exploração ativa períodos onde potencial de campo apresentava densidade de potência espectral acentuada na faixa de ritmo teta (5-10 Hz). O potencial de campo referente aos períodos de exposição do animal foi submetido a transformada rápida de Fourier e espectro de potência.

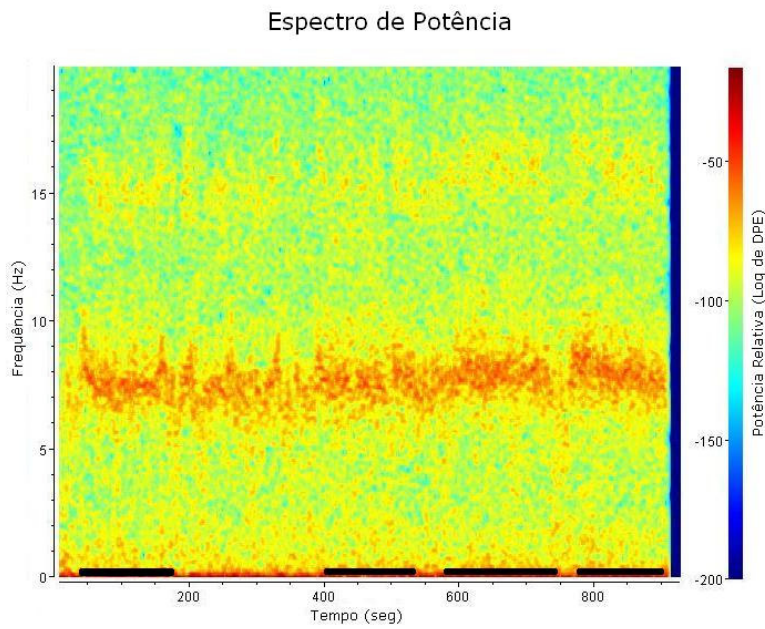


Fig. 11 – Espectro de potência do período de exposição aos braços. Linhas pretas em baixo marcam os períodos selecionados como amostras de cada braço. (Densidade de potência espectral, DPE)

Crítérios de seleção dos ‘neurônios representativos’

Para a seleção de subgrupos de neurônios representativos, analisamos a atividade da população de neurônios enquanto o animal explorava os quatro braços do labirinto, e classificamos cada neurônio como representante de um braço baseados em dois critérios: taxa de disparo^(a) e grau de sincronia entre pares^(b):

(a) Taxa de disparo: comparamos a mediana da taxa de disparo de cada neurônio entre os quatro períodos de exposição aos braços. Os neurônios que apresentaram taxa de disparo estatisticamente superior em um dos braços foram classificados como neurônios representativos do braço em questão. Utilizamos o teste estatístico Kruskal-Wallis para comparação das amostras.

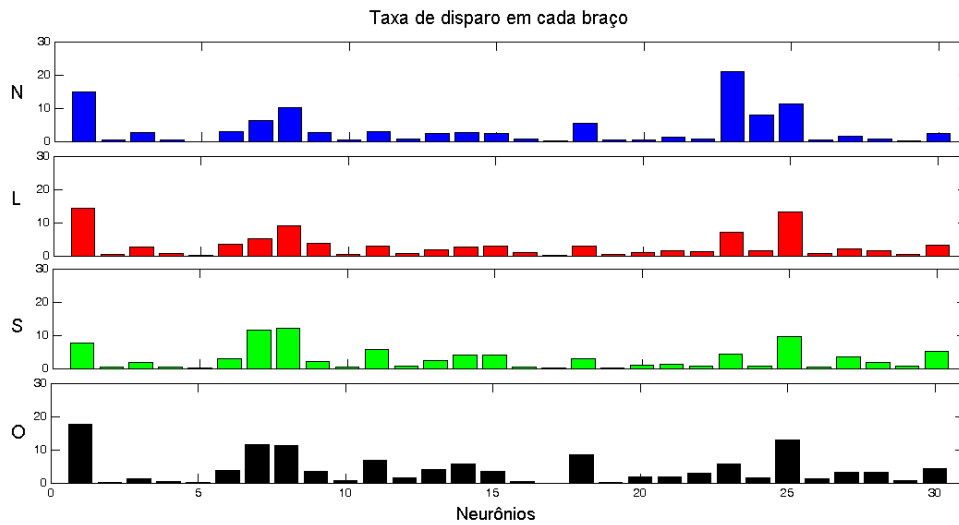


Fig. 12 – Seleção de neurônios representativos por taxa de disparo. Média da taxa de disparo de cada neurônio da população nos quatro braços do labirinto.

(b) Sincronia entre pares: calculamos o coeficiente de correlação cruzada entre todos os possíveis pares da população de neurônios durante os quatro períodos de exposição aos braços. A correlação de Pearson da taxa de disparo entre dois neurônios foi calculada dentro de janelas de 250 milissegundos. Aqueles pares que se correlacionavam acima de um limiar previamente estabelecido (r crítico = 0,3) foram selecionados para representar o braço em questão.

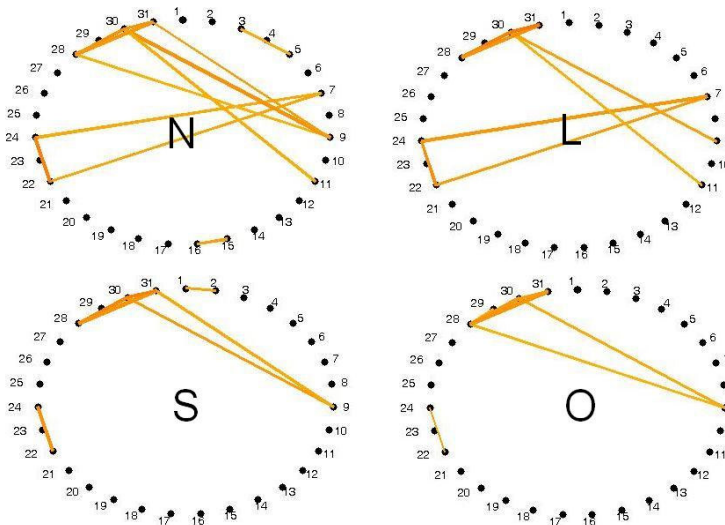


Fig 13 – Seleção de neurônios representativos por sincronia entre pares. Cada ponto do círculo representa um neurônio da população, e a linha que conecta os neurônios representa o grau da correlação entre o par codificado em cores. Apenas são mostradas as correlações acima do limiar estabelecido ($r > 0,3$) para um dia de experimento do animal 01.

ANÁLISE DO SONO

Avaliamos dois parâmetros de atividade de populações neuronais durante o sono: taxa média de disparo nas cinco sessões de sono; e grau de correlação do padrão de atividade de cada sessão de sono com o padrão de atividade dos quatro braços.

(1) Cálculo da atividade neuronal média em cada sessão de sono:

Compararmos as médias das distribuições de taxa de disparo de todos os neurônios registrados entre as cinco sessões de sono (5 populações estatísticas).

Coletamos aleatoriamente 100 amostras de cinco segundos da atividade da população de neurônios em uma dada sessão de sono. Calculamos a média da taxa de disparo das 100 amostras coletadas em cada neurônio, e assim, obtivemos a distribuição das médias da população.

As distribuições das taxas de disparo da população foram promediadas de acordo com o número de sessões experimentais de cada animal, para então serem promediadas entre os animais. O teste ANOVA de medidas repetidas foi utilizado para a comparação das médias.

(2) Similaridade entre padrões populacionais usando correlação de Pearson:

Calculamos a similaridade entre padrões de atividade de populações de neurônios segundo método desenvolvido por Louie & Wilson [18], onde uma janela deslizante (ao passo de 1,25 s) é usada para escanear cada sessão de sono e correlacioná-la aos padrões de atividade dos quatro períodos de exposição aos braços (de duração entre

100-200 s). O nível de similaridade é dado pelo grau de correlação de Pearson entre as matrizes modelo e alvo:

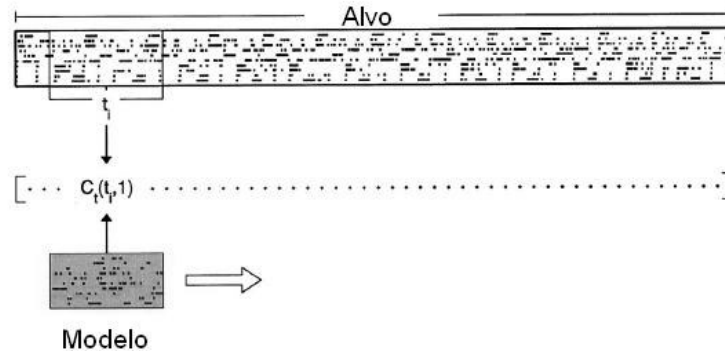


Fig. 14 – Análise da similaridade de padrões populacionais. ‘Alvo’ representa a matriz de atividade da população durante o SOL; ‘modelo’ representa as matrizes de atividade da população em cada braço; C_t é o nível de correlação matricial, t_i é o período do alvo comparado, e 1 é o modelo do braço.

Para verificar se determinada sessão de sono apresenta diferença de similaridade com os quatro braços, as correlações de cada braço foram promediadas através de todas as sessões experimentais de cada animal, e entre os animais. O teste ANOVA de medidas repetidas foi utilizado para comparação das médias.

Para comparar os níveis de similaridade da atividade do braço alvo com as sessões de sono prévia (PRE) e subsequente (POS), usamos teste *t-Student* não pareado.

IV – RESULTADOS

1 – Análise comportamental

Através da análise do comportamento, usando teste ANOVA de medidas repetidas e teste *post hoc* Tukey, verificamos que houve diferença de desempenho entre os blocos de tarefa espacial. Ainda que tal diferença não tenha sido encontrada para todos os animais, na média dos animais a porcentagem de acertos foi significativamente menor no último bloco em relação ao primeiro e segundo blocos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os dados compreendem 12 dias de treinamento para o animal 01, e 9 dias de treinamento para os animais 02 e 03.

Não foram encontradas diferenças significativas nos dois outros parâmetros de desempenho analisados: número de tentativas para atingir o critério, e latência de entrada nos braços.

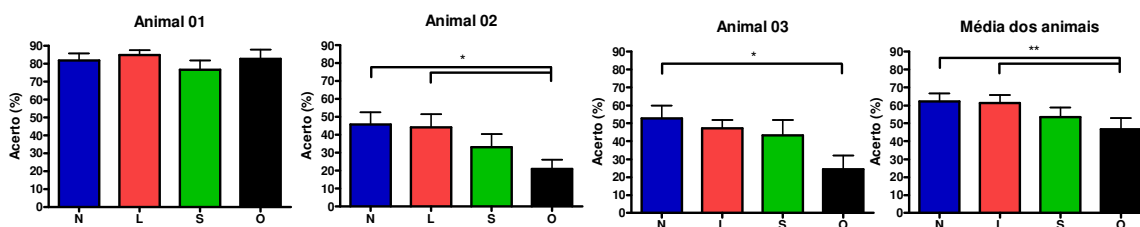


Fig. 15 – Porcentagem de acertos em cada braço.

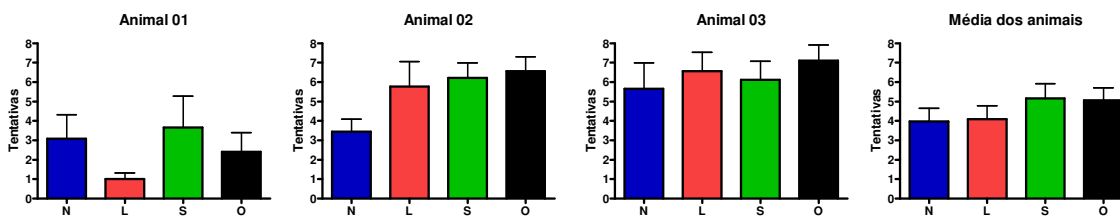


Fig. 16 – Número de tentativas necessárias até atingir o critério.

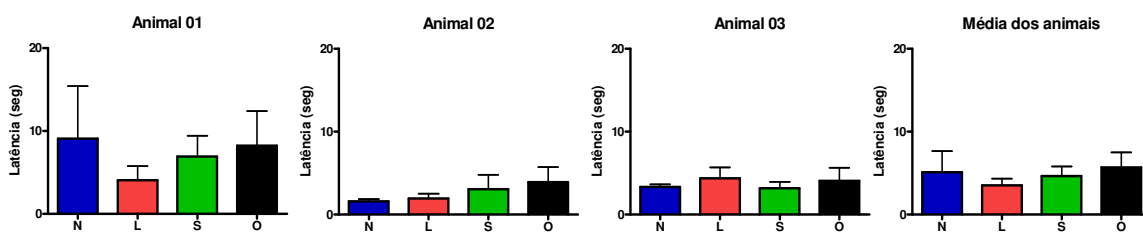


Fig. 17 – Latência para entrada nos braços.

2 – Análise da vigília

Foram registrados 144 neurônios hipocampais em três animais treinados na tarefa por 9-12 dias, até atingir o critério de 7 acertos nas últimas 10 tentativas. O animal 01 foi submetido a 12 dias consecutivos de registro e, em média, 30 neurônios foram registrados diariamente. O animal 02 foi submetido a 3 dias de registro e, em média, 57 neurônios foram registrados diariamente. O animal 03 foi submetido a 2 dias de registro e, em média, 57 neurônios foram registrados diariamente. No total para os três animais, foram 38 neurônios registrados ao longo de 17 sessões experimentais.

Inicialmente analisamos a atividade da população de neurônios hipocampais enquanto os animais exploravam o labirinto. Verificamos que subpopulações de neurônios apresentam diferenças de atividade entre os quatro braços do labirinto analisado. Isso nos permitiu eleger subgrupos de neurônios representativos para cada braço, através da taxa de disparo e do grau de sincronia entre pares.

Verificamos que 68,5% dos neurônios registrados apresentam diferentes taxas de disparo entre os quatro braços do labirinto. Como mostra a figura 18, a média do número de neurônios representativos compondo cada subgrupo não foi estatisticamente diferente entre os braços. Respectivamente, os quatro subgrupos de neurônios representativos, N, L, S e O, eram compostos em média por 15,8%, 21,2%, 14,1% e 17,4% da população de neurônios. Os resultados apresentam as médias entre os animais e os EPM.

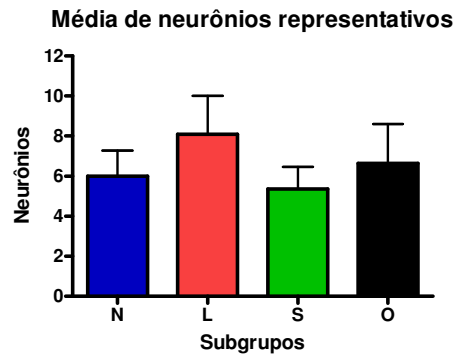


Fig. 18 – Média e EPM do número de neurônios representativos selecionados por taxa de disparo compondo cada subgrupo.

Por outro lado, verificamos que, em média, 52,6% dos neurônios analisados apresentaram grau de similaridade entre pares acima do critério estabelecido ($r > 0,3$). Isso mostra que os pares da população interagem de maneira diferente em cada braço, formando assinaturas neurais particulares para cada ambiente. Como mostra a figura 19, a média do número de neurônios representativos compondo cada subgrupo não foi diferente entre os braços. Respectivamente, os quatro subgrupos de neurônios representativos, N L S, O, eram compostos em média por 41,3%, 38%, 40,5% e 39,8% da população de neurônios.

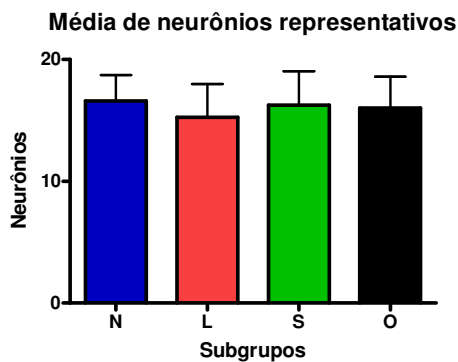


Fig. 19 – Média e EPM do número de neurônios representativos selecionados por sincronia entre pares compondo cada subgrupo.

3 – Análise do sono

Para a análise de toda a população, apresentamos a média de todas as sessões de cada animal e da média entre os animais. Para a análise de subpopulações são mostradas as médias entre os animais.

3.1 – TAXA DE DISPARO

3.1.1 – Análise da taxa de disparo de toda a população de neurônios

De modo geral, a taxa de disparo nas cinco sessões de sono não segue um mesmo padrão para os três animais (Fig. 20). Para o animal 01, a taxa de disparo da sessão 01 foi menor que a taxa de disparo de todas as outras sessões; e na sessão 05 foi maior que todas as outras sessões. Para o animal 02, a sessão 02 apresentou taxa de disparo significativamente menor que as outras sessões. Para o animal 03, todas as sessões foram significativamente diferentes, exceto as sessões 02 e 03. Na média dos animais, todas as sessões foram significativamente diferentes, exceto as sessões 02 e 03.

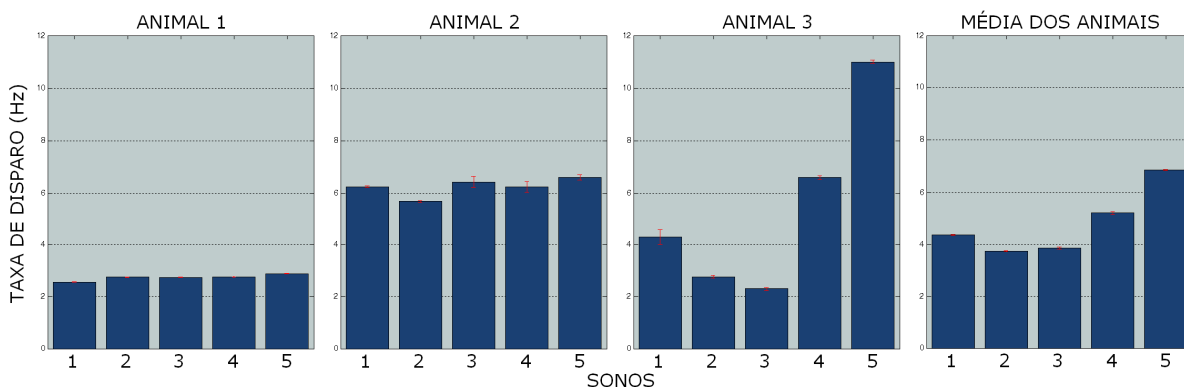


Fig. 20 – Média e EPM da taxa de disparo da população de neurônios nas cinco sessões de sono, para cada animal e a média dos animais.

3.1.2 – Análise da taxa de disparo de subgrupos de neurônios eleitos por taxa de disparo.

A figura 21 mostra como a taxa de disparo de cada subgrupo se comporta em uma dada sessão de sono. Os quatro subgrupos de neurônios representativos se comportam diferentemente dentro de cada sessão de sono.

Na sessão de sono 1, o subgrupo O, seguido dos subgrupos N e S, apresentaram taxas de disparo maiores que o subgrupo L. Na sessão 2, o subgrupo S apresentou a maior taxa de disparo. Na sessão 3 as taxas de disparo são maiores para os subgrupos O, seguido pelos S, L, N. Na sessão de sono 4, o subgrupo S apresentou a maior taxa de disparo; seguido dos L e O, seguidos do N. Na sessão 5 não houve diferença entre os subgrupos.

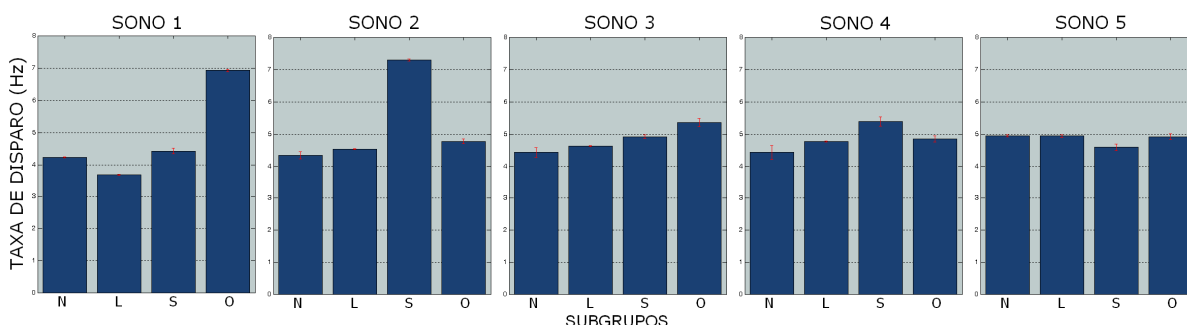


Fig. 21 – Média e EPM da taxa de disparo dos subgrupos de neurônios selecionados por taxa de disparo em cada sessão de sono, média dos animais.

A figura 22 mostra como a taxa de disparo de cada subgrupo se comporta ao longo das cinco sessões de sono. Cada subgrupo apresenta uma evolução particular da taxa de disparo ao longo das cinco sessões de sono. Foram observadas diferenças na taxa de disparo entre as cinco sessões de sono.

Os subgrupos N e L apresentam elevação sistemática da taxa de disparo com passar das sessões de sono, sendo a sessão 5 a maior para os dois subgrupos. Enquanto o subgrupo S apresenta maior taxa de disparo na sessão de sono 2, e o

subgrupo O apresenta maior taxa de disparo na sessão de sono 1.

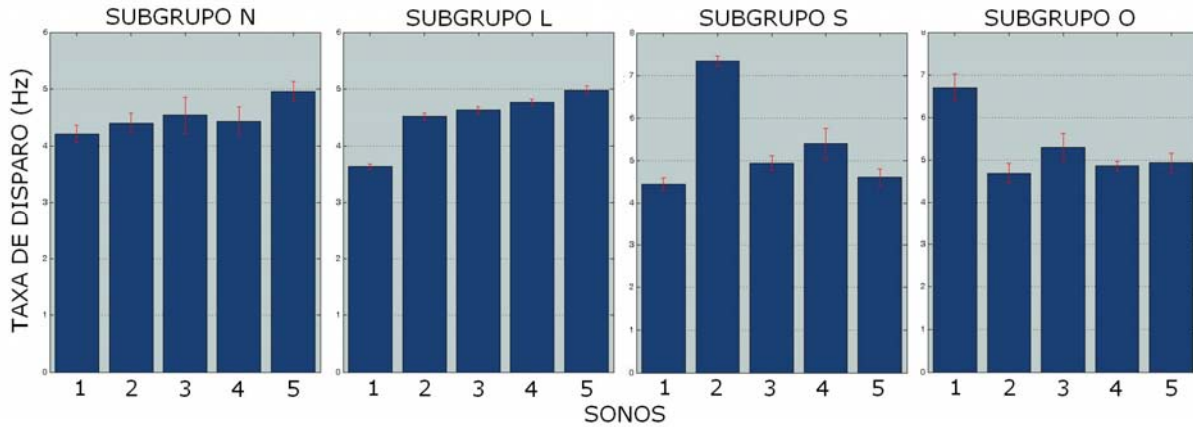


Fig. 22 – Média e EPM da taxa de disparo de cada subgrupo de neurônios selecionados por taxa de disparo nas cinco sessões de sono, média dos animais.

3.1.3 – Análise da taxa de disparo de subgrupos de neurônios eleitos por sincronia entre pares.

A figura 23 mostra como a taxa de disparo dos quatro subgrupos se comportam em uma dada sessão de sono. De modo geral, os quatro subgrupos de neurônios representativos se comportam de maneira muito semelhante dentro de uma sessão de sono, ainda que diferenças estatísticas tenham sido encontradas entre os subgrupos L e O no sono 2.

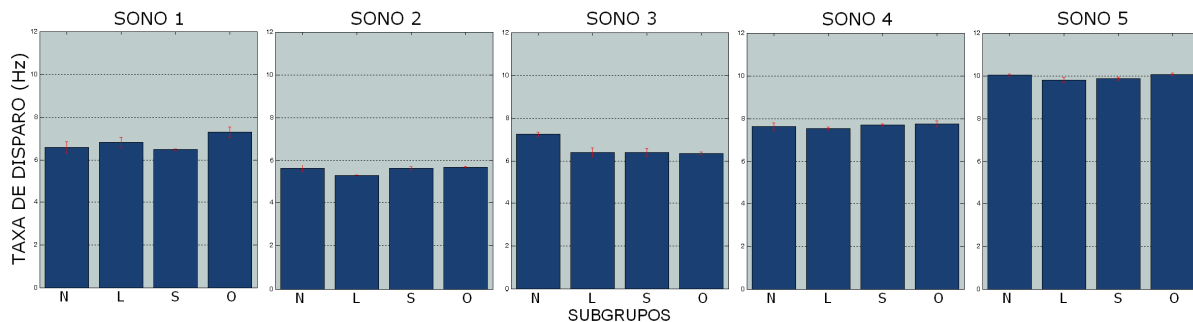


Fig. 23 – Média e EPM da taxa de disparo dos subgrupos de neurônios selecionados por sincronia entre pares em cada sessão de sono.

A figura 24 mostra como a taxa de disparo de cada subgrupo se comporta ao longo das cinco sessões de sono. Ainda que, para um dado subgrupo, tenham sido observadas diferenças na taxa de disparo entre as cinco sessões de sono, de modo geral, os quatro subgrupos se comportam de maneira muito semelhante ao longo das cinco sessões de sono. A taxa de disparo é sistematicamente maior nas sessões de sono 5, seguidas pelas sessões 4, 3 e 1, sendo as sessões de sono 2 sempre as menores.

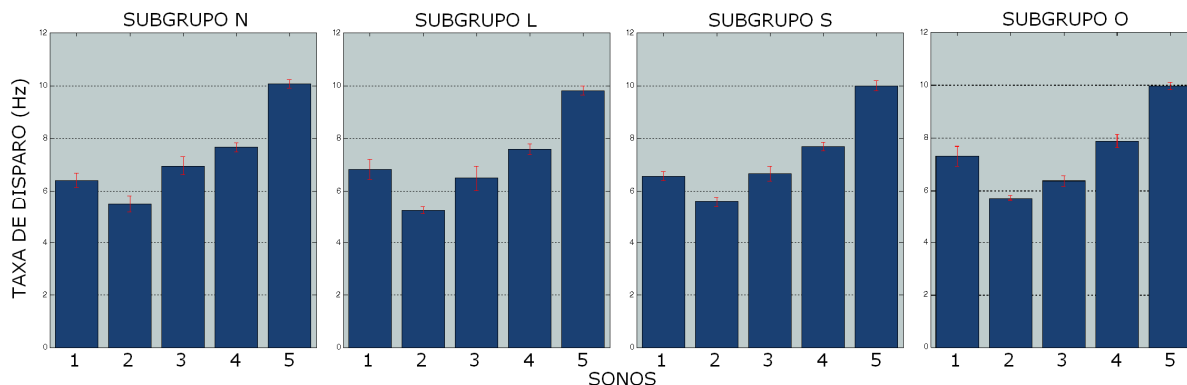


Fig. 24 – Média e EPM da taxa de disparo de cada subgrupo de neurônios selecionados por sincronia entre pares nas cinco sessões de sono.

Verificamos que a taxa de disparo de toda a população varia consideravelmente entre os animais nas diferentes sessões de sono. E mais especificamente, que subgrupos selecionados por taxa apresentam diferentes níveis de atividade dentro de cada sessão de sono, assim como diferentes níveis de atividade ao longo das cinco sessões de sono. Em contraste, subgrupos selecionados por sincronia entre pares apresentam níveis de atividade semelhantes dentro de cada sessão de sono.

3.2 – SIMILARIDADE DO SONO COM OS BRAÇOS

3.2.1 – Nível de similaridade através de diferentes subpopulações

Como mostrado na figura 25, maiores níveis de similaridade são observados quando a atividade de toda a população de neurônios é comparada. Os níveis de

similaridade usando os subgrupos selecionados por sincronia entre pares são menores (* $p < 0,05$) que àquelas usando toda a população de neurônios; e ainda assim, são maiores que os níveis de similaridade usando os subgrupos selecionados por taxa de disparo (** $p < 0,001$). Os níveis de similaridade dos subgrupos selecionados por taxa de disparo também são significativamente menores que as correlações de toda a população (** $p < 0,001$).

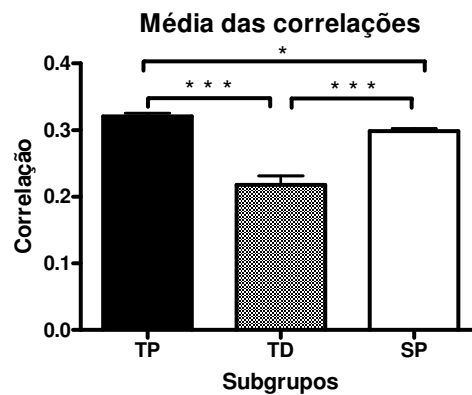


Fig. 25 – Comparação das médias dos níveis de similaridade usando toda a população de neurônios (TP), subgrupos selecionados por taxa de disparo (TD), e subgrupos selecionados por sincronia entre pares (SP) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

3.2.2 - Similaridade das sessões de sono com o padrão de atividade de cada braço usando toda a população de neurônios.

Da mesma forma que a taxa de disparo, o grau de similaridade da atividade dos quatro braços com a atividade das sessões de sono apresentou variações consideráveis entre os animais. As figuras a seguir mostram o grau de similaridade das sessões de sono analisadas com o padrão de atividade dos quatro braços ao longo do tempo (a) e as médias da similaridade de cada braço (b); assim como a similaridade das sessões de sono prévias (PRE) e subsequentes (POS) à exploração do braço alvo.

Para o animal 01, em nenhuma das sessões de sono foi observada diferença estatística entre o nível de similaridade dos quatro braços (Fig. 26).

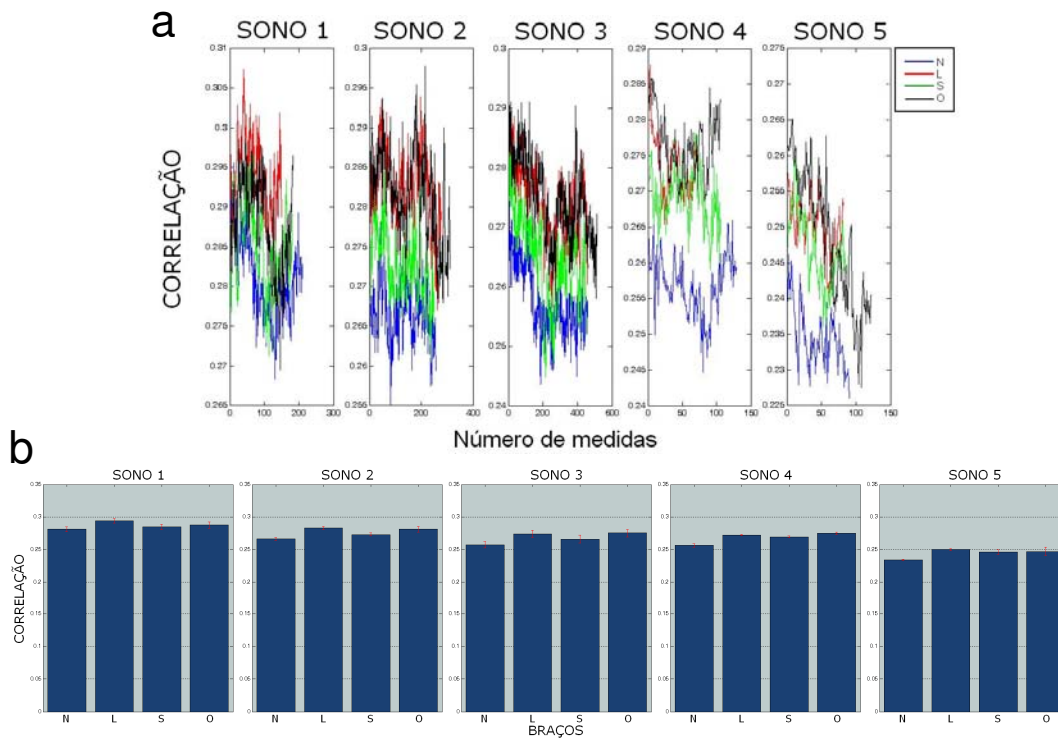


Fig. 26 – Similaridade do animal 01. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da similaridade de cada braço.

A figura 27 mostra a similaridade nas sessões de sono PRE e POS exploração de cada braço, para o animal 01. Todas as comparações apresentaram diferenças significativas entre os níveis de similaridade PRE e POS braço alvo ($P < 0,0001$). O animal 01 apresenta os níveis de similaridade estatisticamente maiores durante os sons PRE que durante os sons POS a exploração do braço alvo.

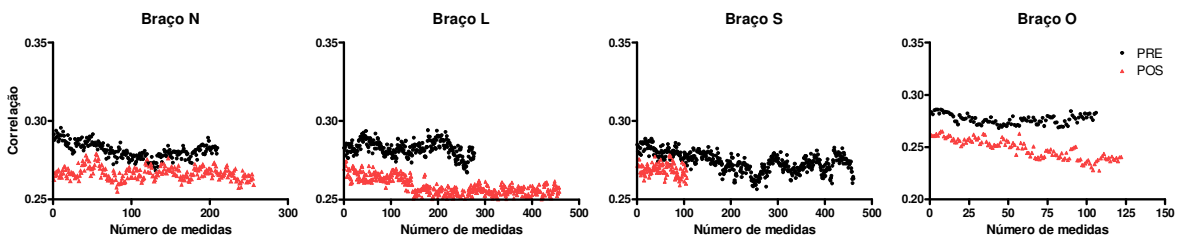


Fig. 27 – Níveis de similaridade das sessões de sono PRE e POS braço alvo, animal 01.

Para o animal 02, a similaridade dos braços N e L foram sistematicamente maiores em todas as sessões de sono (Fig. 28).

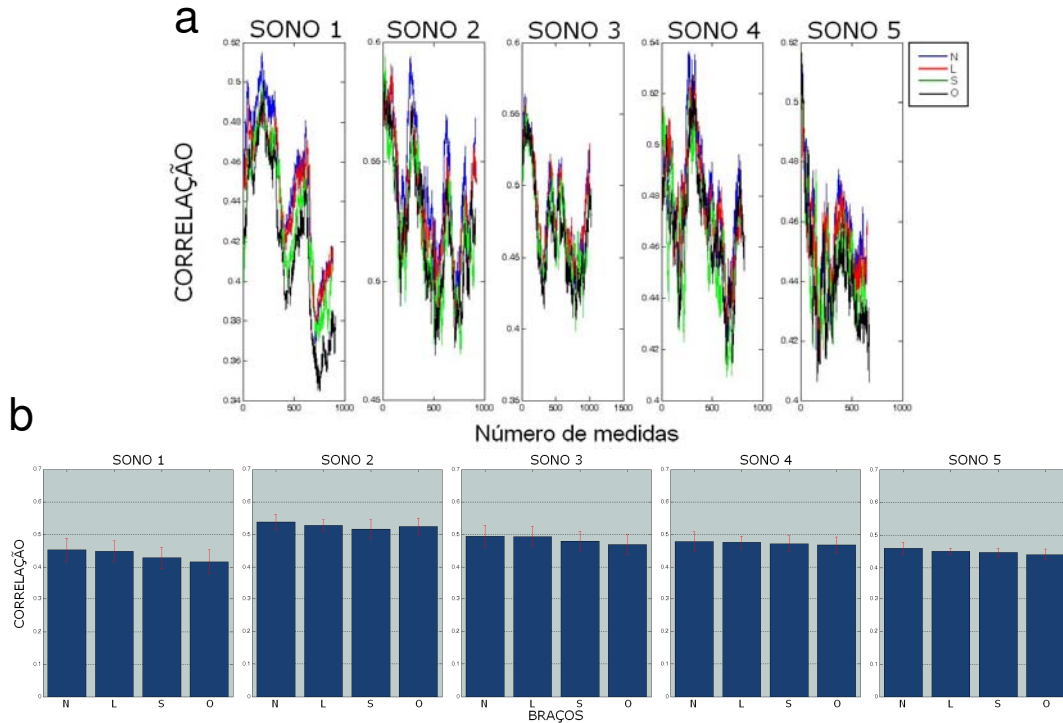


Fig. 28 – Similaridade do animal 02. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da similaridade de cada braço.

A figura 29 mostra os níveis de similaridade nas sessões de sono PRE e POS exploração de cada braço, para o animal 02. As comparações dos braços N, L e S apresentaram diferenças significativas entre as similaridades PRE e POS braço alvo ($P < 0,0001$), entretanto apresentam tendências variáveis entre as explorações.

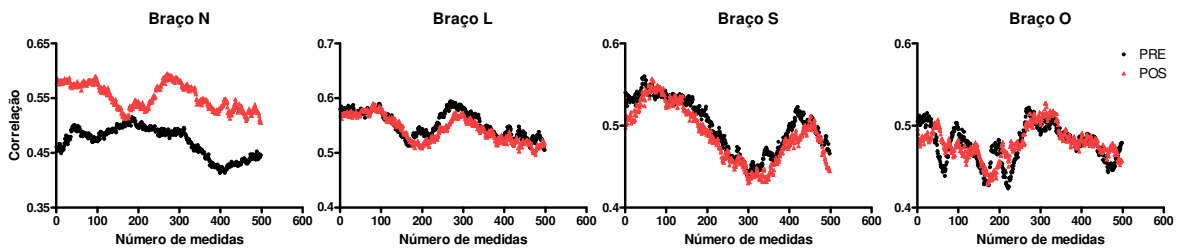


Fig. 29 – Níveis de similaridade das sessões de sono PRE e POS braço alvo, animal 02.

Para o animal 03, as sessões 1 e 2 apresentaram similaridade maior para os braços O, L e N, que para o braço S; enquanto nas outras sessões as similaridades de cada braço não apresentaram diferenças significativas (Fig. 30).

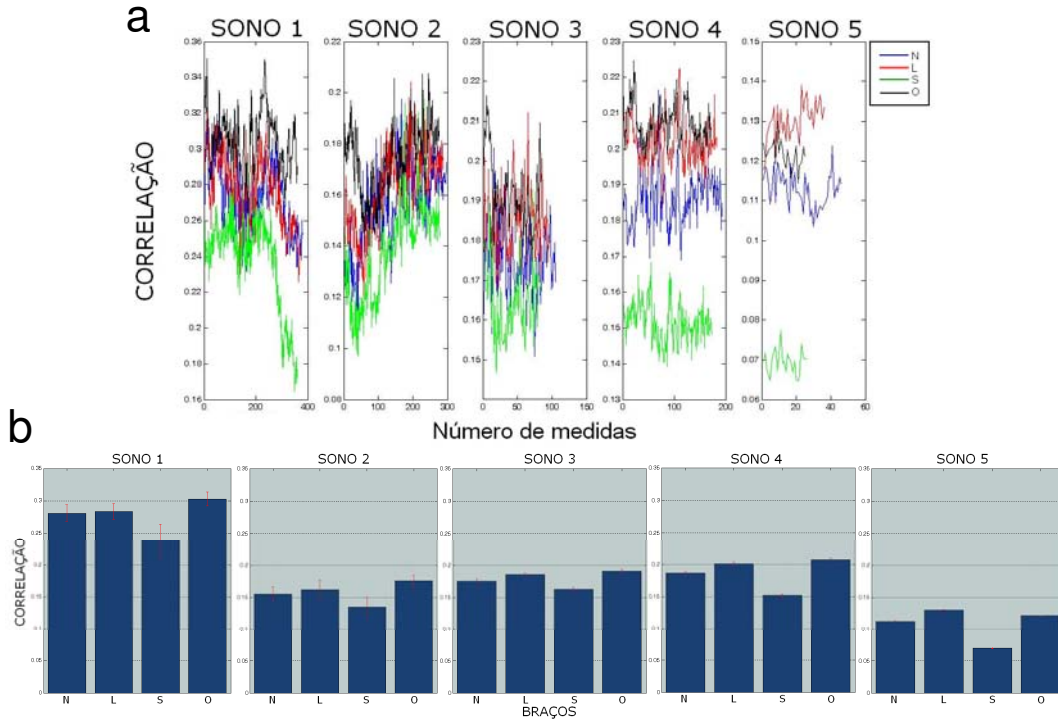


Fig. 30 – Similaridade do animal 03. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da similaridade de cada braço.

A figura 31 mostra os níveis de similaridade nas sessões de sono PRE e POS exploração de cada braço, para o animal 03. Todas as comparações apresentaram diferenças significativas entre as similaridades PRE e POS braço alvo ($P < 0,0001$), entretanto apresentam tendências variáveis entre as explorações.

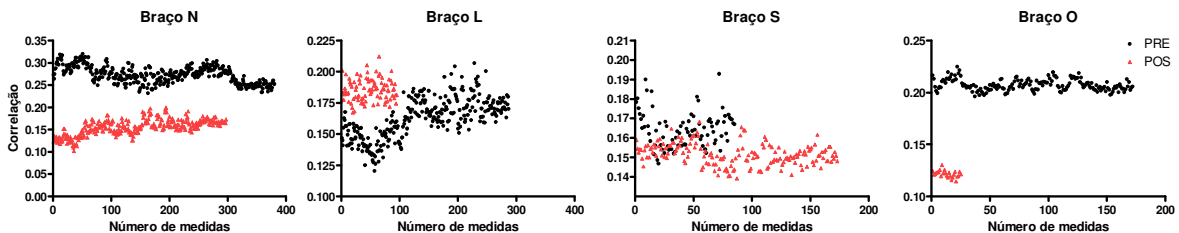


Fig. 31 – Níveis de similaridade das sessões de sono PRE e POS braço alvo, animal 03.

Na média dos três animais, apenas a sessão de sono 2 apresentou níveis de similaridade maiores para os braços L, O, e N, que para o braço S (Fig. 32).

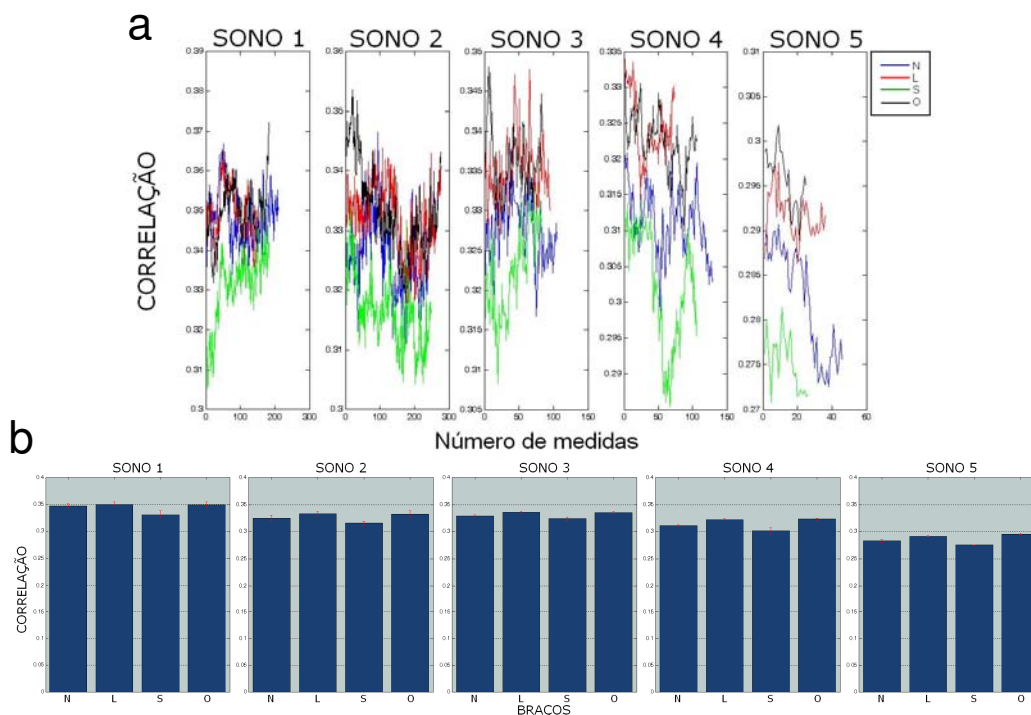


Fig. 32 – Similaridade média dos animais. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da similaridade de cada braço.

A figura 33 mostra os níveis de similaridade nas sessões de sono PRE e POS exploração de cada braço, média dos animais. Todas as comparações apresentaram diferenças significativas entre as similaridades PRE e POS braço alvo ($P < 0,0001$), com tendências claras de maiores níveis de similaridade nas sessões de sono PRE que nas sessões POS as explorações do braço alvo.

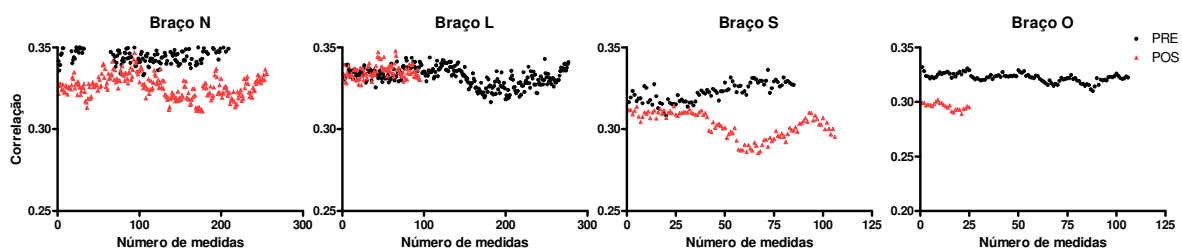


Fig. 33 – Níveis de similaridade das sessões de sono PRE e POS braço alvo, média dos animais.

3.2.3 - Similaridade do padrão de atividade de cada braço com as cinco sessões de sono usando subpopulação de neurônios selecionados por taxa disparo.

A figuras adiante mostram como as similaridades dos subgrupos N, L, S e O, se comportam ao longo das cinco sessões de sono; também mostram a média das similaridades dos quatro braços em cada sessão de sono. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre o grau de similaridade dos braços em nenhuma das sessões de sono analisadas.

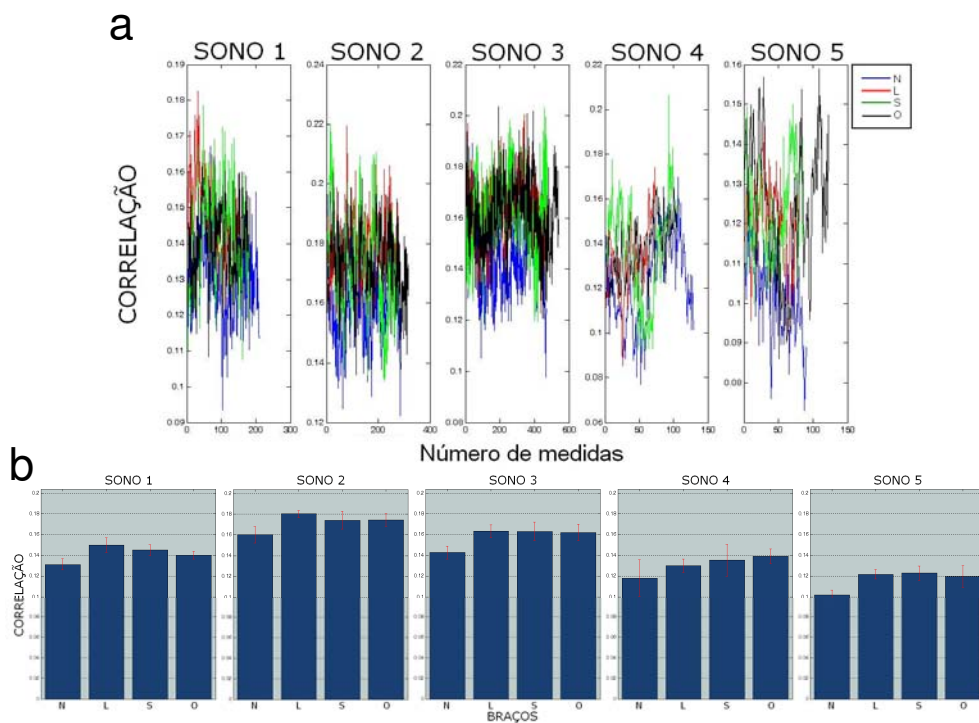


Fig. 34 – Similaridade dos neurônios representativos N, média dos animais. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM

da similaridade de cada braço.

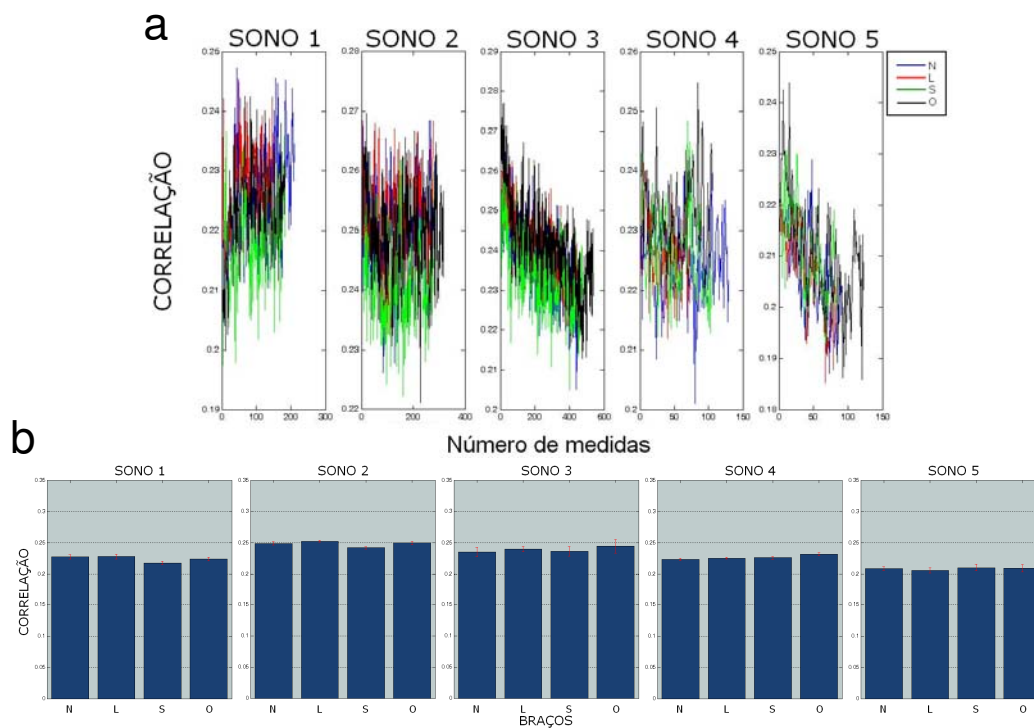


Fig. 35 – Similaridade dos neurônios representativos L, média dos animais. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da similaridade de cada braço.

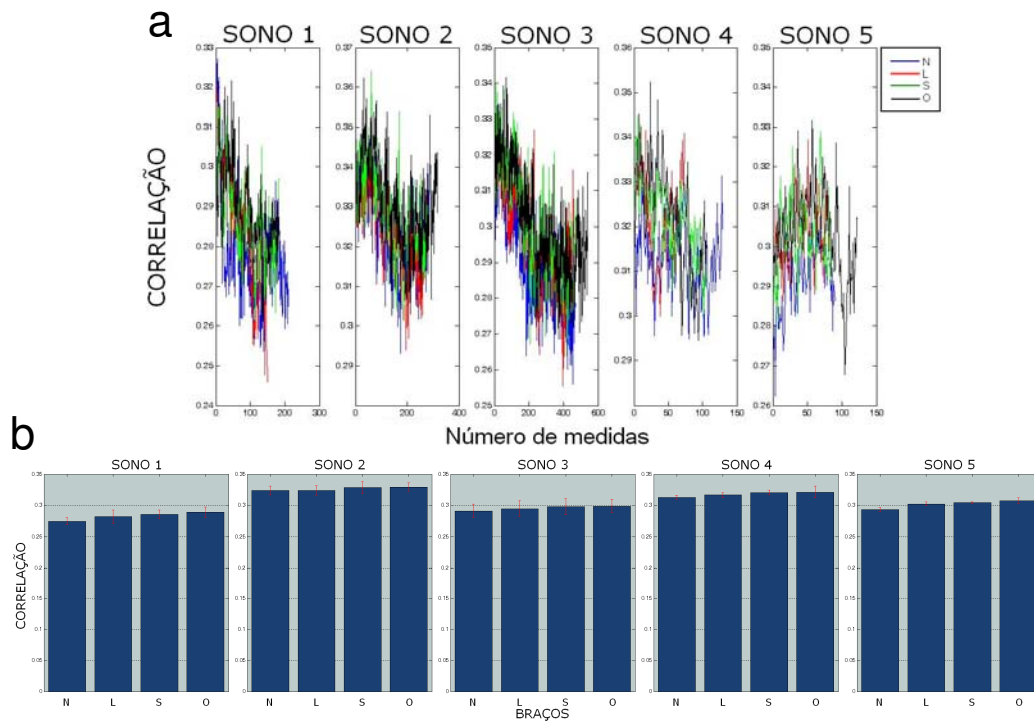


Fig. 36 – Similaridade dos neurônios representativos S, média dos animais. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da correlação de cada braço.

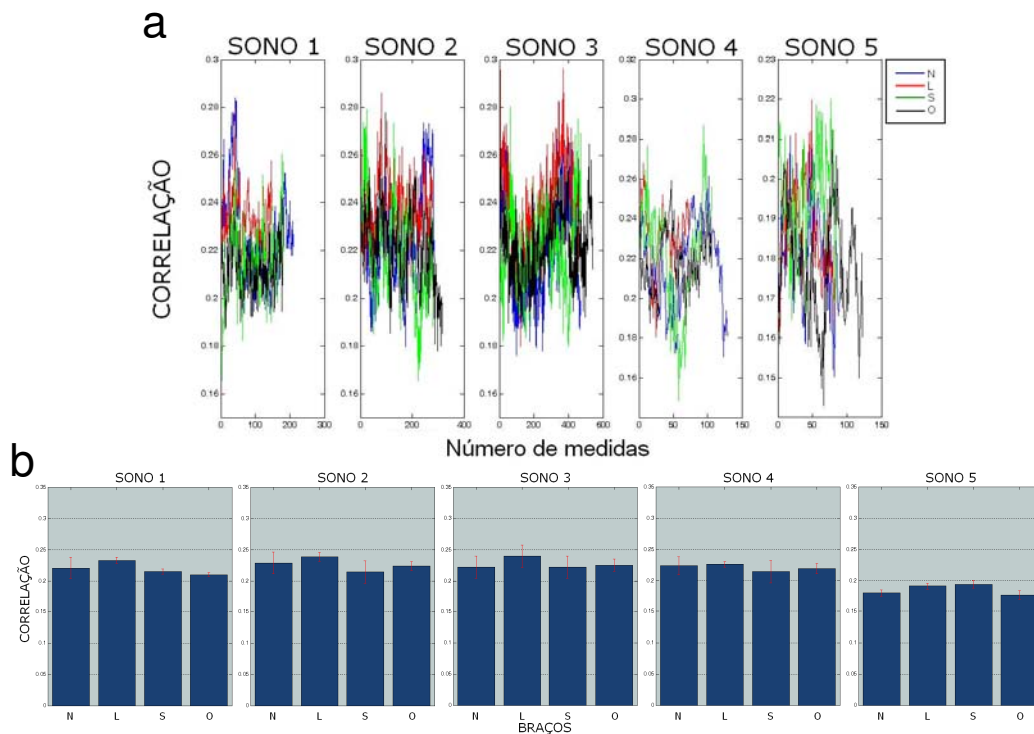


Fig. 37 – Similaridade dos neurônios representativos O, média dos animais. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da similaridade de cada braço.

A figura 38 mostra a similaridade nas sessões de sono PRE e POS exploração de cada braço usando apenas os neurônios selecionados por taxa de disparo, média dos animais. Todas as comparações apresentaram diferenças significativas entre os níveis de similaridade PRE e POS braço alvo ($P < 0,0001$), entretanto apresentam tendências variáveis entre as explorações.

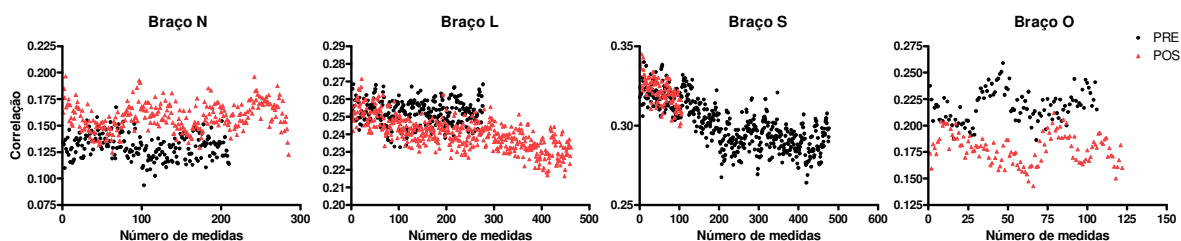


Fig. 38 – Níveis de similaridade das sessões de sono PRE e POS braço alvo usando neurônios selecionados por taxa de disparo, média dos animais.

3.2.4 - Similaridade do padrão de atividade de cada braço com as cinco sessões de sono usando subpopulação de neurônios selecionados por sincronia entre pares.

Diferentemente dos resultados observados para subgrupos de neurônios selecionados por taxa de disparo, os subgrupos selecionados por sincronia entre pares apresentam diferenças no nível de similaridade entre os braços.

A figuras adiante mostram como a similaridade dos subgrupos N, L, S e O, se comportam ao longo das cinco sessões de sono; também mostram a média das similaridades dos quatro braços em cada sessão de sono. O subgrupo N apresentou maior grau de similaridade para o braço O nos sonos 1 e 2. Nas outras sessões de sono não foram observadas diferenças significativas.

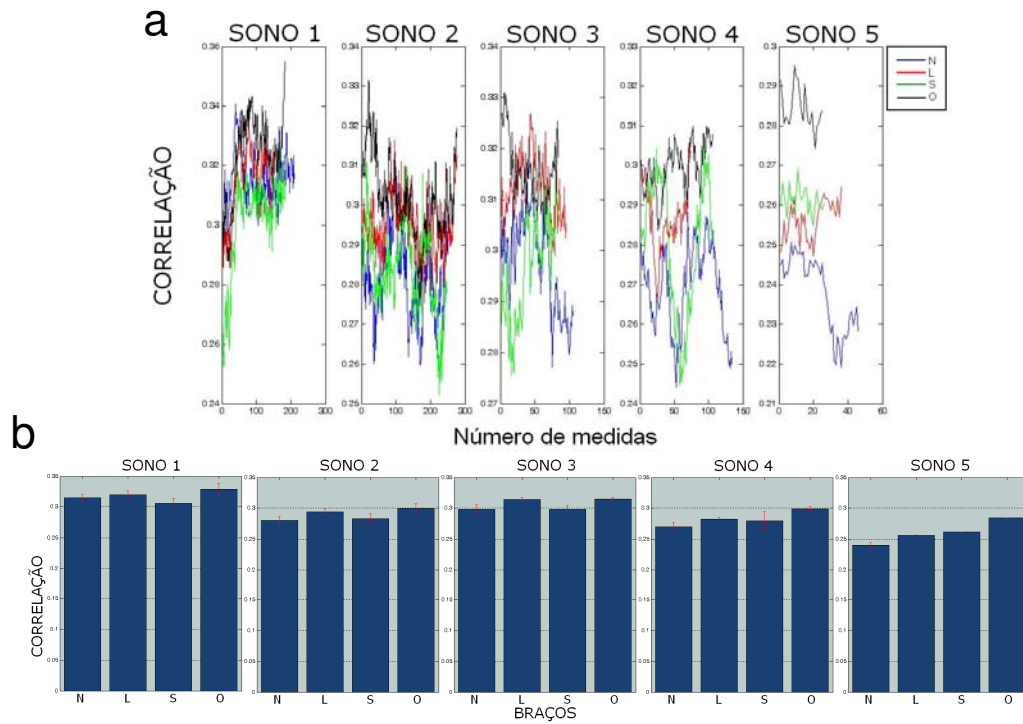


Fig. 39 – Similaridade dos neurônios representativos N, média dos animais. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da similaridade de cada braço.

Para os subgrupos L, S e O, o sono 1 apresentou maior similaridade com os braços N e O, enquanto o sono 2 apresentou maior similaridade com os braços O e L. Nas outras sessões de sono não foram observadas diferenças significativas.

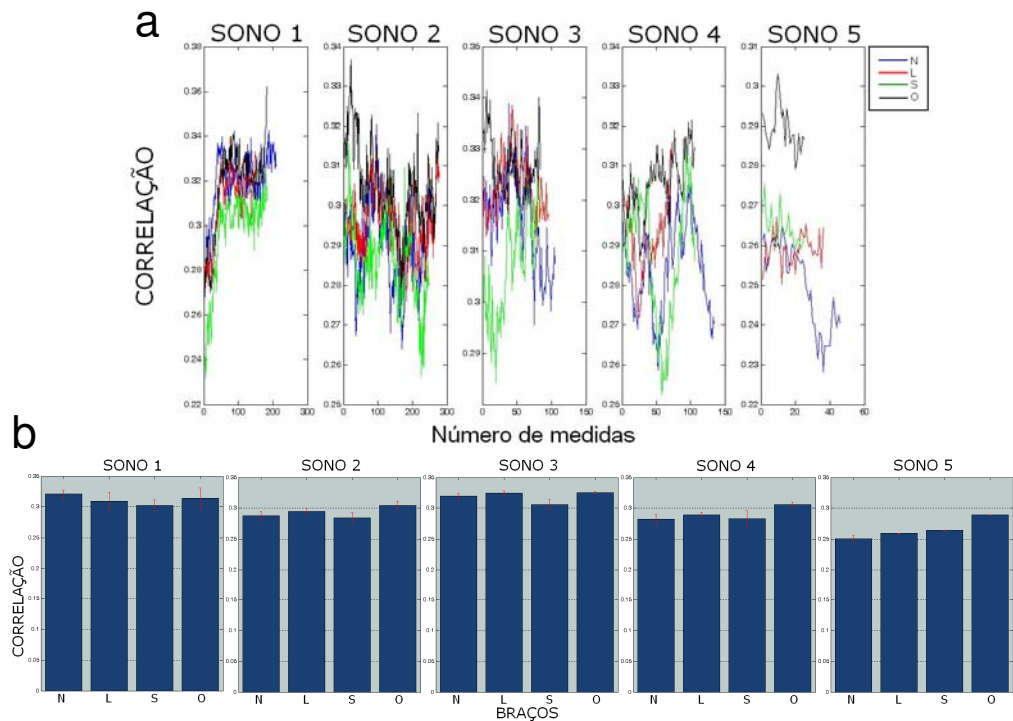


Fig. 40 – Similaridade dos neurônios representativos L, média dos animais. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da similaridade de cada braço.

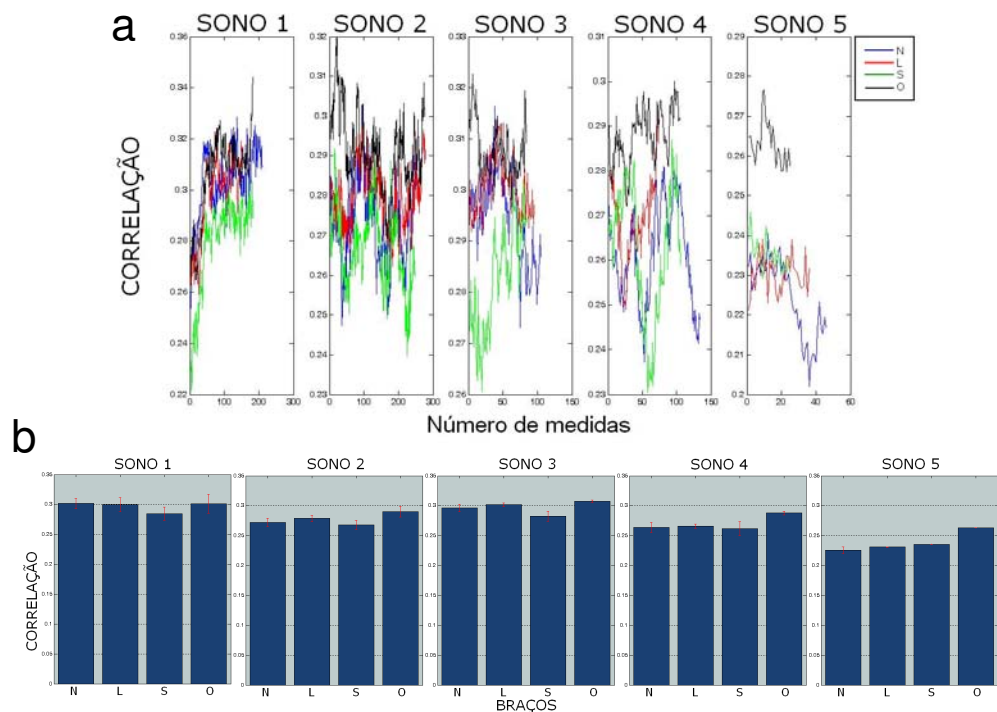


Fig. 41 – Similaridade dos neurônios representativos S, média dos animais. a) O nível de

similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da similaridade de cada braço.

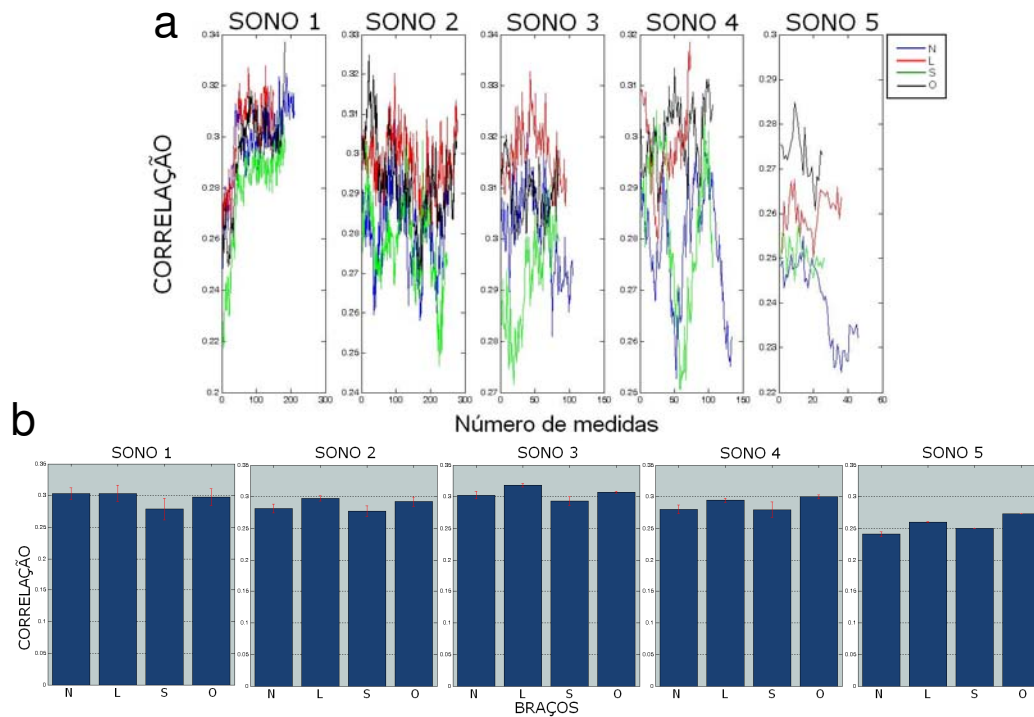


Fig. 42 – Similaridade dos neurônios representativos O, média dos animais. a) O nível de similaridade do padrão de atividade de cada braço ao longo do tempo de sono. b) Média e EPM da similaridade de cada braço.

A figura 43 mostra os níveis de similaridade nas sessões de sono PRE e POS exploração de cada braço usando apenas os neurônios selecionados por sincronia entre pares, média dos animais. Todas as comparações apresentaram diferenças significativas entre os níveis de similaridade PRE e POS braço alvo ($P < 0,0001$), com tendências claras de maior similaridade nas sessões de sono PRE que nas sessões POS as explorações do braço alvo.

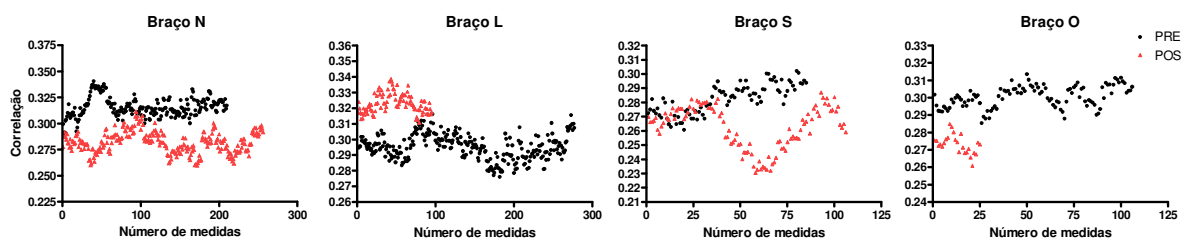


Fig. 43 – Níveis de similaridade das sessões de sono PRE e POS braço alvo usando neurônios selecionados por sincronia entre pares, média dos animais.

DISCUSSÃO

Para responder se a atividade neural durante o sono pode refletir mudanças ambientais regulares, de modo a reverberar e prever a atividade característica dos ambientes visitados, registramos a atividade de populações de neurônios hipocampais durante sessões de sono intercaladas por tarefa espacial regularmente modificada.

Com o objetivo de provocar a ativação de diferentes subgrupos de neurônios, elaboramos um delineamento experimental que exigiu dos animais a exploração de um ambiente diferente a cada bloco de tarefa espacial. Isso foi obtido através da mudança regular da localização da recompensa no decorrer de treinamentos longitudinais (9-12 dias) do protocolo. Tendo cada animal atingido um critério mínimo de acertos na realização da tarefa, registramos a atividade de populações de neurônios hipocampais durante a realização da tarefa bem como durante o sono que intercala os blocos de exploração espacial.

Para investigar se a atividade neural no sono pode refletir atividade relacionada à exploração dos ambientes recentemente ou futuramente visitados, calculamos as taxas médias de disparo de subgrupos de neurônios representativos. Com o mesmo objetivo, calculamos os níveis de similaridade entre os padrões de atividade do sono e os padrões de atividade de cada braço do labirinto. Não foram detectadas diferenças significativas entre taxas médias de disparo e entre as similaridades dos quatro braços a cada sessão de sono, mas foram detectadas variações na similaridade das sessões de sono PRE e POS exploração do braço alvo. Estas variações mostram que a atividade do sono PRE se correlaciona mais com a atividade do braço a ser explorado, do que a atividade do sono POS. Simetricamente, na sessão de sono POS exploração do braço alvo os padrões de atividade neuronal parecem tornar-se progressivamente menos semelhantes ao padrão do braço recém-visitado. Isso é particularmente visível no rato 01, que foi o animal mais repetidamente treinado na tarefa. Maior correlação do sono com o braço recompensado

no futuro imediato sugere que a atividade neural do sono pode prever mudanças ambientais regulares.

1 – Comportamento

As diferenças existentes na porcentagem de acertos entre os braços mostram que o desempenho dos animais não é o mesmo nos quatro blocos de tarefa espacial. Ainda que tais diferenças não tenham sido encontradas no comportamento de todos os animais, elas são significativas quando a média dos animais é analisada.

Duas hipóteses podem ser levantadas na tentativa de justificar diferenças de desempenho entre os braços do labirinto. A primeira hipótese é uma redução da motivação dos animais pela busca da recompensa nos últimos blocos de tarefa espacial devido ao número de recompensas já recolhidas em blocos anteriores, fato inerente à organização cronológica do delineamento experimental. Para testar isso, pretendemos futuramente comparar a potência do potencial de campo na banda teta (5-7 Hz) entre cada bloco de tentativas, esperando que a potência decaia no decorrer do protocolo experimental. O ritmo teta hipocampal é um bom correlato de atenção na vigília exploratória [58, 59].

Uma segunda hipótese seria a existência de diferenças na disponibilidade e qualidade da informação espacial entre os ambientes analisados no experimento (tanto nas dicas espaciais da sala, como do próprio labirinto), fazendo com que os locais de recompensa fossem identificados e representados com intensidades diferentes pelos animais. Apesar de nem todos os animais terem apresentado diferentes porcentagens de acertos entre os braços, a possibilidade de haver diferentes quantidades de informação espacial entre os braços merece atenção e não pode ser descartada.

Ainda que tenha havido diferenças significativas na porcentagem de acertos de cada braço, diferenças de desempenho entre os braços não foram encontradas nas duas

outras medidas comportamentais. Tanto o nível de aprendizado da tarefa, representado pelo número de tentativas necessárias para que o critério de aprendizado fosse alcançado, como a velocidade da tomada de decisão do animal, representada pela latência para entrada nos braços, não apresentaram diferenças estatísticas entre os braços. Em conjunto, os resultados indicam que houve aprendizado da tarefa após o treinamento.

2 – Atividade neural durante a vigília

Ao analisar a atividade da população de neurônios hipocámpais enquanto os animais exploravam o labirinto, observamos que subpopulações de neurônios apresentam diferenças de atividade entre os braços. Isso nos permitiu selecionar subgrupos de neurônios representativos de cada braço através de dois critérios: diferentes taxas de disparo entre os braços, e pares de neurônios com sincronização elevada.

A quantidade total de neurônios representativos identificados em nosso experimento (~68%) é um pouco elevada quando comparada a dados da literatura, que estimam a presença de atividade espacial em 30-50% dos neurônios de CA1 no hipocampo dorsal [32, 33]. Talvez isso se deva ao método utilizado para seleção dos neurônios representativos de cada braço, qual seja a comparação das taxas de disparo médias entre os quatro braços. Além disso, os braços de nosso labirinto têm área aproximada (~750 cm²) semelhante ao tamanho médio de um campo espacial, o qual varia em função das dimensões do campo explorado (média estimada entre 200 e 2800 cm²) [60].

A fim de selecionar subgrupos de neurônios representativos para cada braço pelo método da sincronização, foi estabelecido um grau de sincronia mínimo de 0,3 para que dois neurônios fossem considerados correlacionados. Esse limiar é bastante alto quando comparado ao adotado em outros estudos. Por exemplo, Hirase e cols [61] e Wilson &

McNaughton [15] utilizam como limiar para inclusão quaisquer correlações entre pares acima de 0,05, e 0,2, respectivamente. Ainda assim, cada subgrupo foi composto em média por 16 neurônios com grau de sincronia superior ao limiar estabelecido, o que equivale a 42,15% de toda a população de neurônios registrados.

Nossa intenção ao selecionar pares de neurônios fortemente sincronizados foi identificar as subpopulações de neurônios codificando a informação de cada braço. A sincronia de potenciais de ação entre dois neurônios é considerada um processo de codificação de informação, onde as interações temporais dos disparos neurais permitem a integração dos estímulos e da informação do ambiente [32, 36, 38]. Esse tipo de organização envolve a atividade temporalmente coordenada de agrupamentos neuronais anatomicamente distribuídos.

Como um todo, nossos resultados indicam que cada braço do labirinto é codificado diferentemente pela atividade da população de neurônios hipocampais. Esse resultado vai ao encontro de estudos correlacionando a atividade de neurônios hipocampais às diferentes posições do animal no espaço [32, 36]. O fato de a representação dos braços se dever a populações neuronais parcialmente sobrepostas mas mesmo assim distintas, nos permitiu compor subgrupos de neurônios correlacionados a cada braço, estabelecendo assinaturas neurais dos ambientes explorados na vigília, capazes de serem comparadas aos padrões de atividade neuronal durante as sessões de sono.

3 – Atividade neural durante o sono

De acordo com a hipótese de reativação neuronal durante o sono, a atividade de populações de neurônios hipocampais reverbera no sono os padrões de disparo ocorridos durante as experiências prévias da vigília. A fim de testar essa hipótese, avaliamos se a atividade de populações neuronais durante o sono reflete o comportamento dos animais através dos blocos de exploração espacial do labirinto.

3.1 – Taxa de disparo

Como observado nas análises de toda a população de neurônios, os três animais apresentaram diferentes perfis de variação de taxa de disparo ao longo das cinco sessões de sono. Os animais com menor número de sessões experimentais registradas (i. e. menos amostras coletadas) apresentaram maiores variações da taxa de disparo entre as sessões de sono. Talvez a variação de taxa de disparo observada entre as sessões de sono diminua com o aumento do número de amostras de sono de cada animal possivelmente devido a um aprofundamento do treinamento. Na média dos animais, a taxa de disparo apresenta uma queda após a primeira sessão de sono, seguida de uma elevação acima dos níveis iniciais nas sessões 4 e 5.

Para verificar se as subpopulações de neurônios mais ativos em cada braço apresentam elevação seletiva da taxa de disparo durante o sono, nós avaliamos a taxa de disparo de cada subpopulação ao longo das cinco sessões de sono e comparamos as subpopulações dentro de cada sessão.

Quando analisados individualmente, os subgrupos apresentam uma evolução particular das taxas de disparo ao longo das cinco sessões de sono. Isso mostra que neurônios que apresentam diferentes taxas de disparo entre os braços, também apresentam comportamentos diferenciados durante o sono. Entretanto, a taxa média de disparo dos subgrupos analisados não reflete a rotina de visitação aos braços do labirinto realizada pelo animal.

Segundo mostrado por Hirase e cols [61], a média da taxa de disparo populacional de neurônios piramidais no hipocampo não se altera entre sessões de sono separadas por novidade, ou por experiências habituais. Além disso, a taxa de disparo de neurônios individuais se mantém correlacionada entre sessões de sono intercaladas por tarefa espacial em ambientes habituais, mas é modificada por novas experiências. Isso sugere que, quando os animais são expostos a novas experiências, grupos de neurônios têm sua

taxa aumentada, enquanto outros diminuída, mantendo inalterada a taxa global. Nossos resultados corroboram esse estudo na medida em que subgrupos de neurônios se comportam de maneira diferente ao longo das sessões de sono, aumentando ou diminuindo a taxa de disparo da subpopulação. Entretanto, apesar de apresentarem subgrupos funcionais durante a vigília e o sono, a atividade de subpopulações de neurônios hipocampais durante o sono não reflete mudanças ambientais especificamente relacionadas ao local da recompensa passada ou futura.

Analisadas individualmente, as taxas médias de disparo dos quatro subgrupos de neurônios selecionados por sincronia entre pares evoluem de maneira semelhante ao longo das cinco sessões de sono. O resultado demonstra que a formação de subgrupos de neurônios fortemente sincronizados durante a exploração de cada braço, não se reflete na taxa de disparo durante as sessões de sono. Isso corrobora a noção de que taxas médias de disparo não refletem mudanças mnemônicas no hipocampo quando não existe novidade. Para testar mais profundamente essa hipótese, pretendemos realizar uma análise similar nos dados coletados no início do treinamento, quando a experiência ainda é novidade. Em tese, deveríamos observar aumentos nas taxas de disparo durante o sono pós-braço, de forma análoga ao obtido por Pavlides & Winson[14].

3.2 – Similaridade com os braços

Para verificar se a atividade de populações de neurônios hipocampais durante o sono reflete os padrões de atividade exibidos durante a exploração de cada braço do labirinto, comparamos a atividade ao longo de cada sessão de sono com os padrões de atividade coletados dos quatro braços.

Verificamos que os maiores níveis de similaridade são encontrados quando a atividade de toda a população de neurônios hipocampais é analisada. A similaridade média de subgrupos de neurônios representativos, selecionados por taxa de disparo ou

por sincronia entre pares, é menor que a similaridade alcançada na análise de toda a população de neurônios (ver Fig. 25). À primeira vista esse resultado não parece intuitivo, isto é, em princípio as correlações deveriam ser maiores nos subgrupos em virtude de sua maior especificidade. Entretanto, é legítimo supor que o aumento do número de neurônios “inespecíficos” na amostra, com atividade indiferenciada entre braços, possa causar um aumento também “inespecífico” das correlações. Será necessário aprofundar a análise dos dados para determinar efetivamente as causas do efeito.

As sessões de sono apresentaram níveis de similaridade semelhante para os padrões dos quatro braços. Ainda que tenham sido observadas diferenças na atividade dos quatro braços durante a vigília, os padrões se mostraram muito semelhantes entre si, de modo que a métrica utilizada não apresenta diferenças significativas entre os braços. A medida de similaridade entre padrões populacionais provavelmente não é suficientemente sensível para identificar diferenças entre os padrões de atividade de cada braço.

Os resultados das médias das correlações das sessões de sono com a atividade de cada braço usando toda a população de neurônios, subgrupos selecionados por taxa de disparo ou por sincronia entre pares, não nos permitem concluir se a atividade neural durante o sono reflete mais fortemente o padrão de atividade de um dos braços do labirinto.

Entretanto, maiores níveis de similaridade foram encontrados entre o sono PRE-braço alvo e o padrão de atividade do braço em questão, que entre o sono POS-braço alvo e o padrão de atividade do braço em questão. Comparando os níveis de similaridade entre as sessões de sono PRE e POS exploração de cada braço alvo, observamos que o animal 01 apresenta correlações consistentemente maiores durante os sonos PRE, que durante os sonos POS-braço alvo. O mesmo não ocorre para o animal 02, e ocorre apenas entre sessões de sono PRE e POS exploração dos braços N e O para o animal 03. Ainda assim, as correlações da média dos animais são sistematicamente maiores no

sono PRE-braço alvo do que no sono POS-braço alvo. A comparação entre os níveis de similaridade dos braços alvo com os sonos PRE e POS mostrou que a similaridade é maior no sono que antecede a tarefa do que no sono subsequente.

A atividade do sono PRE-braço alvo apresentar maior similaridade com o padrão de atividade do braço alvo que a atividade do sono POS-braço alvo sugere que a atividade de populações de neurônios hipocampais durante o sono pode prever a localização de recompensas em ambientes regularmente modificados. É interessante ressaltar que esse resultado se mostrou mais nítido para o animal 01, o qual foi submetido a 12 sessões de treinamento (todas registradas) e apresentou o resultado de desempenho comportamental mais estável entre os três animais. Por outro lado, animal 02 apresentou os piores resultados comportamentais, com diferenças na porcentagem de acertos entre os braços, e também as piores diferenças entre as correlações PRE e POS obtidas, o que reforça a necessidade de um aprendizado consistente da tarefa para que haja atividade correlacionada a ambientes futuros. Já para o animal 03, assim como para a média dos animais, os resultados de maior similaridade no sono PRE-tarefa se repetem em quase todas as sessões analisadas.

Para investigar mais profundamente a questão de reverberação versus predição na atividade de neurônios hipocampais, pretendemos realizar análises adicionais no futuro próximo. Parece crucial analisar o comportamento das correlações longitudinalmente, acompanhando dia a dia as mudanças no nível de similaridade. Esperamos que as diferenças entre correlações nos sonos PRE e POS cresçam com o tempo, isto é, com o aumento da previsibilidade da tarefa.

Também pretendemos refinar a análise de correlações, considerando a fase do disparo neuronal com relação à oscilação do potencial de campo. Esse análise é importante porque existe uma relação íntima entre potencial de ação e potencial de campo, com uma tendência de disparo nos picos das oscilações <4Hz durante o sono de

ondas lentas [62, 63] e padrões mais complexos no caso do ritmo teta (5-7Hz), que é característico do sono REM [31, 64, 65]. Também será importante tentar identificar os padrões de cada braço durante o sono utilizando uma rede neural artificial para classificação de padrões [66] .

Finalmente, pretendemos realizar novos registros neurais para testar duas hipóteses. A primeira é que a capacidade preditiva das populações neuronais deverá ser aumentada quando for mais importante comportamentalmente realizar a escolha correta de braço na tarefa. Em outras palavras: em condições de recompensa mais exigentes, esperamos que a capacidade preditiva dos neurônios hipocampais seja maximizada. Isso poderá ser testado reduzindo o número de tentativas e aumentando o tamanho da recompensa por tentativa. A segunda hipótese que pretendemos testar é que a capacidade preditiva do hipocampo será destruída se a localização itinerante da recompensa perder regularidade estatística, isto é, se a localização da recompensa entre sessões for aleatória.

As capacidades preditivas e proféticas do sono e dos sonhos são assuntos investigados por filósofos e pensadores desde a Antiguidade. Nossos achados eletrofisiológicos da predição de recompensas podem contribuir para que a sociedade contemporânea dê maior credibilidade às características oraculares do universo onírico.

VI – CONCLUSÕES

Observamos maiores correlações entre a atividade do sono PRE-braço alvo com o braço recompensado no futuro imediato do que correlações entre a atividade do sono POS-braço alvo com o braço recém visitado, o que indica que a atividade neural do sono pode refletir as mudanças na localização da recompensa em ambientais regulares.

Subgrupos de neurônios que apresentam diferentes taxas de disparo entre os braços durante exploração, também apresentam taxas de disparo diferentes ao longo das sessões de sono, sem entretanto, refletir a rotina de visitação aos braços do labirinto realizada pelo animal.

Nossos resultados sugerem que a atividade de populações de neurônios hipocampais durante o sono pode prever a localização de recompensas em ambientes regularmente modificados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Steriade, *Grouping of brain rhythms in corticothalamic system*. Neuroscience, 2006. **vol. 137**(4): p. 1087-1106.
2. Maquet, P., *The role of sleep in learning and memory*. Science, 2001. **294**(5544): p. 1048-1052.
3. Stickgold, R., et al., *Sleep, learning, and dreams: off-line memory reprocessing*. Science, 2001. **294**(5544): p. 1052-7.
4. Jenkins, J.B. and K.M. Dallenbach, *Oblivescence during sleep and waking*. Am. J. of Psychology, 1924. **35**: p. 605-612.
5. Pearlman, C. and M. Becker, *REM sleep deprivation impairs bar-press acquisition in rats*. Physiol. Behav., 1974. **13**(6): p. 813-7.
6. Pearlman, C.A., *Effect of rapid eye movement (dreaming) sleep deprivation on retention of avoidance learning in rats*. Report US Naval Submarine Medical Center, 1969. **22**(1): p. 1-4.
7. Fishbein, W., *Disruptive effects of rapid eye movement sleep deprivation on long-term memory*. Physiol. Behav., 1971. **6**(4): p. 279-82.
8. Gutwein, B.M., P.J. Shiromani, and W. Fishbein, *Paradoxical sleep and memory: long-term disruptive effects of Anisomycin*. Pharmacol Biochem Behav, 1980. **12**(3): p. 377-84.
9. Karni, A., et al., *Dependence on REM sleep of overnight improvement of a perceptual skill*. Science, 1994. **265**(5172): p. 679-682.
10. Maquet, P., et al., *Sleep-related consolidation of a visuomotor skill: brain mechanisms as assessed by functional magnetic resonance imaging*. J Neurosci, 2003. **23**(4): p. 1432-1440.
11. Kapur, S., et al., *Neuroanatomical correlates of encoding in episodic memory - levels of processing effect*. PNAS USA, 1994. **91**(6): p. 2008-2011.
12. Wagner, U., et al., *Sleep inspires insight*. Nature, 2004. **427**: p. 352 - 355.
13. Ribeiro, S. and M.A.L. Nicolelis, *Reverberation, storage and postsynaptic propagation of memories during sleep*. Learn. Mem., 2004. **11**(6): p. 686-696.
14. Pavlides, C. and J. Winson, *Influences of hippocampal place cell firing in the awake state on the activity of these cells during subsequent sleep episodes*. J. Neurosci., 1989. **9**(8): p. 2907-18.
15. Wilson, M.A. and B.L. McNaughton, *Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep*. Science, 1994. **265**(5172): p. 676-9.
16. Ribeiro, S., et al., *Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas*. PLoS Biology, 2004. **2**(1): p. 126-137.
17. Ribeiro, S., et al., *Novel experience induces persistent sleep-dependent plasticity in the cortex but not in the hippocampus*. Frontiers in Neuroscience, 2007. **1**(1): p. 43-55.
18. Louie, K. and M.A. Wilson, *Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep*. Neuron, 2001. **29**(1): p. 145-56.
19. Pastalkova, E., et al., *Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus*. Science, 2008. **321**(1322-1327).
20. Buzsaki, G., *Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective*. J Sleep Res, 1998. **7**(Suppl 1): p. 17-23.
21. Ribeiro, S., et al., *Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience*. Learn Mem, 1999. **6**(5): p. 500-8.
22. Ribeiro, S., et al., *Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-*

- movement sleep*. J Neurosci, 2002. **22**(24): p. 10914-23.
23. Datta, S., et al., *Activation of phasic pontine-wave generator prevents rapid eye movement sleep deprivation-induced learning impairment in the rat: a mechanism for sleep-dependent plasticity*. J. Neurosci., 2004. **24**(6): p. 1416-1427.
 24. Ulloor, J. and S. Datta, *Spatio-temporal activation of cyclic AMP response element-binding protein, activity-regulated cytoskeletal-associated protein and brain-derived nerve growth factor: a mechanism for pontine-wave generator activation-dependent two-way active-avoidance memory processing in the rat*. J. Neurochem., 2005. **95**(2): p. 418-428.
 25. Scoville, W.B. and B. Milner, *Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions*. J Neurol. Neurosurg. Psych., 1957. **20**: p. 11-21.
 26. Squire, L.R., *Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans*. Psychol Rev, 1992. **99**(2): p. 195-231.
 27. Mishkin, M., *Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus*. Nature, 1978. **273**(5660): p. 297-8.
 28. Buzsaki, G., L.S. Chen, and F.H. Gage, *Spatial organization of physiological activity in the hippocampal region: relevance to memory formation*. Prog Brain Res, 1990. **83**: p. 257-68.
 29. Winocur, G., R.M. McDonald, and M. Moscovitch, *Anterograde and retrograde amnesia in rats with large hippocampal lesions*. Hippocampus, 2001. **11**(1): p. 18-26.
 30. O'Keefe, J. and J. Dostrovsky, *The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat*. Brain Research, 1971. **34**(1): p. 171-5.
 31. Itskov, V.P., E.; Mizuseki, K. Buzsaki, G.; Harris, K.;, *Theta-mediated dynamics of spatial information in hippocampus*. The Journal of Neuroscience, 2008. **28**(23): p. 5959-5964.
 32. Wilson, M.A. and B.L. McNaughton, *Dynamics of the hippocampal ensemble code for space*. Science, 1993. **261**(5124): p. 1055-8.
 33. O'Mara, S.M., *Spatially selective firing properties of hippocampal formation neurons in rodents and primates*. Prog Neurobiol, 1995. **45**(3): p. 253-274.
 34. Muller, R., *A quarter of a century of place cells*. Neuron, 1996. **17**: p. 979-990.
 35. Leutgeb, S.L., J. K.; Barnes, C. A. ; Moser, E. I.; McNaughton, B. L.; Moser, M., *Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles*. Science, 2005. **309**: p. 619-623.
 36. Harris, K.D., *Organization of cell assemblies in the hippocampus*. Nature, 2003. **424**: p. 552-556.
 37. Brown, E.N., et al., *A statistical paradigm for neural spike train decoding applied to position prediction from ensemble firing patterns of rat hippocampal place cells*. The Journal of Neuroscience, 1998. **18**(18): p. 7411-7425.
 38. O'Neill, J., et al., *Reactivation of experience-dependent cell assembly patterns in the hippocampus*. Nature Neuroscience, 2008. **11**(2): p. 209-215.
 39. Ainge, J., A.; Tamosiunaite, M.; Woergoetter, F.; Dudchenko, P. A., *Hippocampal CA1 place cells encode intended destination on a maze with multiple choice points*. The Journal of Neuroscience, 2007. **27**(36): p. 9769-9779.
 40. Johnson, A. and A.D. Redish, *Neural ensembles in CA3 transiently encode paths forward of the animal decision point*. The Journal of Neuroscience, 2007. **27**(45): p. 12176-12189.
 41. Schacter, D.L., D.R. Addis, and R.L. Buckner, *Remembering the past to imagine the future: the prospective brain*. Nature Reviews Neuroscience, 2007. **8**: p. 657-661.

42. Gelbard-Sagiv, H.M., R.; Harel, M.; Malach, R.; Fried I., *Internally generated reactivation of single neurons in human hippocampus during free recall*. Science, 2008. **322**: p. 96-101.
43. Okuda, J., et al., *Thinking of the future and the past: The roles of the frontal pole and the medial temporal lobes*. NeuroImage, 2003. **19**: p. 1369-1380.
44. Botzung, A., E. Denkova, and L. Manning, *Experiencing past and future personal events: functional neuroimaging evidence on the neural bases of mental time travel*. Brain and Cognition, 2008. **66**: p. 202-212.
45. Hassabis, D.K., D.; Vann, S. D.; Maguire, E. A., *Patients with hippocampal amnesia cannot imagine new experiences*. PNAS, 2007. **104**(5): p. 1726-1731.
46. Hok, V., et al., *Goal-related activity in hippocampal place cells*. The Journal of Neuroscience, 2007. **27**(3): p. 472-482.
47. Schultz, W., P. Dayan, and P.R. Montague, *A neural substrate of prediction and reward*. Science, 1997. **275**: p. 1593-1599.
48. Fortin, N.J., K.L. Agster, and H.B. Eichenbaum, *Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events*. Nature Neuroscience, 2002. **5**(5): p. 458-462.
49. Lee, A.K. and M.A. Wilson, *Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep*. Neuron, 2002. **36**(6): p. 1183-94.
50. Drosopoulos, S., et al., *Sleep enforces the temporal order in memory*. PLoS ONE, 2007. **2**: p. e376.
51. Euston, D.R., M. Tatsumo, and B.L. McNaughton, *Fast-forward playback of recent memory sequences in prefrontal cortex during sleep*. Science, 2007. **318**: p. 1147-1150.
52. Ji, D. and M.A. Wilson, *Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep*. Nat Neurosci, 2007. **10**(1): p. 100-7.
53. Foster, D.J. and M.A. Wilson, *Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state*. Nature, 2006. **440**(30): p. 680-683.
54. Diba, K. and G. Buzsáki, *Forward and reverse hippocampal place-cell sequences during ripples*. Nature Neuroscience, 2007. **10**(10): p. 1241-1242.
55. Nadasdy, Z., et al., *Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus*. J Neurosci, 1999. **19**(21): p. 9497-507.
56. Paxinos, G. and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Compact 3rd edition. ed. 1997, San Diego: Academic Press.
57. Gervasoni, D., et al., *Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions*. J. Neurosci., 2004. **24**(49): p. 11137-11147.
58. Timo-laria, C., et al., *Phases and states of sleep in the rat*. Physiol Behav, 1970. **5**(9): p. 1057-62.
59. Winson, J., *Patterns of hippocampal theta rhythm in the freely moving rat*. Electroenceph Clin Neurophysiol, 1974. **36**(3): p. 291-301.
60. Muller, R.U., J.L. Kubie, and J.B. Ranck, Jr., *Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment*. J Neurosci, 1987. **7**(7): p. 1935-1950.
61. Hirase, H., et al., *Firing rates of hippocampal neurons are preserved during subsequent sleep episodes and modified by novel awake experience*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2001. **98**(16): p. 9386-90.
62. Adey, W.R., C.W. Dunlop, and C.E. Hendrix, *Hippocampal slow waves: distribution and phase relationship in the course of approach learning*. Arch Neurol, 1960. **3**: p. 74-90.
63. O'Keefe, J. and M.L. Recce, *Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm*. Hippocampus, 1993. **3**(3): p. 317-330.
64. Poe, G., et al., *Theta phase precession remnants in REM sleep*. Soc Neurosci Abs, 1997. **23**: p. 505.
65. Poe, G.R., et al., *Experience-dependent phase-reversal of hippocampal neuron*

- firing during REM sleep*. Brain Res, 2000. **855**(1): p. 176-80.
66. Laubach, M., J. Wessberg, and M.A. Nicolelis, *Cortical ensemble activity increasingly predicts behaviour outcomes during learning of a motor task*. Nature, 2000. **405**(6786): p. 567-71.

