



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS LETRAS E ARTES
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA
COGNITIVA E COMPORTAMENTO**



**Da dinâmica oscilatória entre regiões envolvidas no processamento de detecção
de novidades.**

Calline Palma dos Santos

João Pessoa - PB

Novembro de 2020

Calline Palma dos Santos

Da dinâmica oscilatória entre regiões envolvidas no processamento de detecção de novidades.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento da Universidade Federal da Paraíba, para fins de obtenção do título de Mestre, na linha de pesquisa: Psicobiologia: Processos Psicológicos Básicos e Neuropsicologia, sob orientação do Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa.

João Pessoa- PB

Novembro de 2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS LETRAS E ARTES
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA
COGNITIVA E COMPORTAMENTO**

**DA DINÂMICA OSCILATÓRIA ENTRE REGIÕES ENVOLVIDAS NO
PROCESSAMENTO DE DETECÇÃO DE NOVIDADES.**

Calline Palma dos Santos

Assinatura da banca examinadora atestando que a presente dissertação foi defendida e aprovada
em 19/11/2020



PROF. DR. FLÁVIO FREITAS BARBOSA (Presidente)



PROF. DR^a. YWLLIANE DA SILVA RODRIGUES MEURER



PROF. DR. BRYAN DA COSTA SOUZA

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237d Santos, Calline Palma dos.

Da dinâmica oscilatória entre regiões envolvidas no
processamento de detecção de novidades / Calline Palma
dos Santos. - João Pessoa, 2020.

68 f. : il.

Orientação: Flávio Freitas Barbosa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Percepção. 2. Memória espacial. 3. Sinais
eletrofisiológicos. I. Freitas, Flávio Barbosa. II.
Título.

UFPB/BC

CDU 159.937 (043)

A Deus, que é perfeito para além da compreensão humana; Meus pais, os quais precisei estar longe fisicamente para que a saudade nos fizesse conscientes de quanto amor habita entre nós;
Robinho, não existem palavras que expressem toda a minha gratidão, a vocês os créditos...

Dedico

AGRADECIMENTOS

Com poucas palavras deixo meu sincero agradecimento às pessoas com quem me deparei durante essa jornada (sei que cada um de vocês sentirá a gratidão existente em mim), cujo final apontava sempre para um novo horizonte e lugares de mim mesma que eu ainda não conhecia. Estar aqui, neste Estado completamente distante às minhas raízes baianas, me possibilitou criar laços que estarão dentro de mim sempre e sempre.

Deste modo, não poderia deixar de mencionar que o crescimento em termos profissionais tem sido indescritível. Entretanto, o empenho diário em me tornar um ser humano do qual eu mesma aprendi a ter admiração, tem me proporcionado uma crescente sensibilidade aos fenômenos comportamentais e as facetas que o envolvem.

Confesso, minha saúde mental ameaçou me abandonar em vários momentos, fato que me fez reconhecer quanta força, coragem e persistência são necessárias para ir atrás do que nos move o coração e o que nos desperta o desejo pela vida. O qual também me fez compreender quanto respeito, compreensão e paciência devemos ter a nós mesmas a cada passo da caminhada.

Assim, encerro um ciclo bem árduo (e como) para iniciar outro ainda mais excitante e inexplorado, com a convicção de que viver e aprender sobre a vida vale a pena e sempre valerá!

Me percebo inteiramente amor e gratidão por tudo e todos que estiveram comigo, com ou sem barreiras físicas, sintam meu abraço!

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	SISTEMAS DE MEMÓRIA	16
3.	SINAIS ELETROFISIOLÓGICOS.....	20
4.	O PARADIGMA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.	24
5.	PROCESSOS MNEMÔNICOS E ELETROFISIOLOGIA	28
6.	METODOLOGIA.....	30
6.1	Aquisição de dados	30
6.2	Análise de dados eletrofisiológicos	33
6.3	Filtro, obtenção de fase e amplitude	33
6.4	Análise espectral	35
6.5	Acoplamento fase-amplitude	36
6.6	Decomposição não supervisionada de potenciais de campo locais (LFPS)	37
6.7	Extração e quantificação de componentes espectrais teta (tSCs)	38
6.8	Análise estatística	40
7.	RESULTADOS	41
8.	DISCUSSÃO	58
9.	CONCLUSÃO.....	63
10.	REFERÊNCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistemas de memória.	16
Figura 2: O hipocampo e suas conexões.	18
Figura 3: Propriedades neurais oscilatórias.	20
Figura 4: Sinal bruto de LFP com oscilações neuronais filtradas.....	21
Figura 5: Diagrama de ordem média das fases máximas para as sub-bandas gama....	22
Figura 6: Vários tipos de CFC.	22
Figura 7: Diferentes medidas para análise de acoplamento fase-amplitude.....	23
Figura 8: Diagrama das quatro tarefas de memória de reconhecimento de objetos ...	25
Figura 9: Esquema de processamento de informações no hipocampo.....	26
Figura 10: Circuito de interações entre o córtex pré-frontal hipocampal-peririnal.....	28
Figura 11: A fase teta modula a amplitude LG em CA3 hipocampal.....	29
Figura 12: Obtenção de fase e amplitude.....	34
Figura 13: Sinal bruto de LFP filtrado na frequência teta.....	34
Figura 14: Espectrograma.....	35
Figura 15: Análise espectral.....	36
Figura 16: Comodulograma.....	37
Figura 17: Oscilações teta ocorrem durante a exploração de objetos.....	42
Figura 18: Acoplamento teta – gama aumenta durante a exploração.....	44
Figura 19: Ciclos teta acoplam-se a múltiplas oscilações de frequência rápida.....	47
Figura 20: Fases preferenciais da força máxima das tSCs é a mesma.....	49
Figura 21: A força da tSC4 é maior durante a exploração de objetos	52
Figura 22: Controle por <i>bootstrap</i>	54
Figura 23: Ausência de diferenças na força dos tSCs durante evocação.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA1- REGIÃO DO CORNO DE AMON

CA3- REGIÃO DO CORNO DE AMON

CE- CÓRTEX ENTORRINAL

DG- GIRO DENTEADO

EMD- DECOMPOSIÇÃO EM MODOS EMPÍRICOS (EMPIRICAL MODE DECOMPOSITION)

FIR- FILTRO DE RESPOSTA AO IMPULSO FINITA

HFO- HIGH FREQUENCY OSCILATIONS

HG- HIGH GAMMA

ICA- ANÁLISE DE COMPONENTES INDEPENDENTES (INDEPENDENT COMPONENT ANALYSIS)

ICS- INTERVALO DE CONFIANÇA

IMF- FUNÇÃO DE MODO INTRÍNSECO (INTRINSIC MODE FUNCTION)

LEC- CÓRTEX ENTORRINAL LATERAL

LED- EMISSOR DE LUZ VERMELHA

LFPS- LOCAL FIELD POTENTIAL

LG- LOW GAMMA

LTM- LOBO TEMPORAL MEDIAL

MATLAB (MATRIX LABORATORY)

MEC- CÓRTEX ENTORRINAL MEDIAL

MI- ÍNDICE DE MODULAÇÃO (MODULATION INDEX,)

MPFC- CÓRTEX PRÉ FRONTAL

NOR- TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETO

REM- RAPID EYE MOVEMENT

SD- SUBICULO DORSAL

SPW-R- SHARP-WAVE RIPPLES

TSCS- (THETA-NESTED SPECTRAL COMPONENTS).

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: SÍNTESE METODOLÓGICA DOS DADOS UTILIZADOS	30
---	-----------

RESUMO

A memória é uma dentre as funções cognitivas com comprovada relevância para o desenvolvimento de habilidades necessárias à adaptabilidade das espécies, as quais são inerentes à sua sobrevivência. O objetivo aqui proposto foi a análise do acoplamento de frequência cruzada teta-gama durante uma tarefa de reconhecimento de objetos. O objetivo principal foi verificar a existência de uma assinatura eletrofisiológica específica durante a exploração de objetos, tanto na circunstância de novidade (codificação) quanto na evocação. De modo mais específico, foram investigadas diferenças entre o acoplamento fase-amplitude entre teta e múltiplas frequências mais rápidas nas duas situações. A pesquisa foi realizada mediante a utilização do conjunto de dados hc-25 disponibilizado por Michaël Zugaro :“Recordings and timed stimulation of rat dorsal hippocampal area CA1 and medial prefrontal cortex during behavior and sleep (disponível em <http://crcns.org/data-sets/hc/hc-25/>). Os procedimentos metodológicos consistiram na criação de rotinas personalizadas de análise, cujas funções viabilizaram a extração das propriedades do sinal registrado. As propriedades investigadas proporcionaram o estabelecimento do estudo e interpretação das características de funcionamento rítmico das bandas de frequência extraídas a partir do método de decomposição em modos empíricos (empirical mode decomposition – EMD) para a extração dos sinais neurais brutos de Local Field Potentials em diversas bandas de frequência. Deste modo, foram caracterizados ciclos teta individuais (Theta-Nested Spectral Components- tSCs) capturados durante períodos de atividade de comportamento exploratório e de reconhecimento de objetos. Ao comparar a força média das tSCs nos ciclos teta obtidos durante a exploração de objetos e locomoção ativa, encontramos que apenas a força da tSC relacionada a gama é significativamente maior, mesmo quando controlamos para a velocidade do animal. Na sequência, foram comparados os valores de força entre os ciclos da exploração de objetos (por definição quando o animal está parado ou em baixa velocidade) e ciclos durante velocidades lentas (<10 cm/s). Encontramos que, novamente, apenas o tSC4 possui força média maior durante a exploração de objetos, ao passo que os demais tSCs não são significativamente diferentes. A hipótese de trabalho admitida aqui é a de que se a tSC4 está envolvida com a codificação, esperávamos ver uma diminuição da sua força durante o teste; mais ainda, esperamos ver uma diminuição durante a exploração do objeto “antigo” em comparação com o objeto “novo” (deslocado). Todavia, foi visto não foram detectadas diferenças para todas as tSCs. Portanto, devido a limitações de pesquisa e necessidade de adaptações relacionadas ao método de coleta de dados apresentada, estudos mais detalhados e com maior tamanho amostral serão realizados de modo que o estudo seja passível de maiores generalizações.

Palavras-chave: memória de reconhecimento de objetos; memória espacial; sinais eletrofisiológicos.

ABSTRACT

Memory is one of the cognitive functions with proven relevance for the development of skills necessary for the adaptability of species, which are inherent to their survival. The objective proposed here was to analyze the theta-gamma cross-frequency coupling during an object recognition task. The main objective was to verify the existence of a specific electrophysiological signature during object exploration, both in the circumstance of novelty (encoding) and evocation. More specifically, differences between phase-amplitude coupling between theta and multiple faster frequencies in both situations were investigated. The research was carried out using the hc-25 dataset made available by Michaël Zugaro: "Recordings and timed stimulation of rat dorsal hippocampal area CA1 and medial prefrontal cortex during behavior and sleep (available at <http://crcns.org/data-sets/hc/hc-25/>). The methodological procedures consisted in the creation of customized analysis routines, whose functions enabled the extraction of properties from the recorded signal. The properties investigated provided the establishment of the study and interpretation of the characteristics of rhythmic functioning of the frequency bands extracted from the method of empirical mode decomposition (EMD) for the extraction of raw neural signals of Local Field Potentials in various frequency bands. In this way, individual theta cycles (Theta-Nested Spectral Components- tSCs) captured during periods of exploratory behavior activity and object recognition were characterized. When comparing the average strength of the theta cycles obtained during object exploration and active locomotion, we found that only the strength of the gamma-related theta is significantly higher, even when controlling for the speed of the animal. Next, force values were compared between cycles from object exploration (by definition when the animal is stationary or at low speed) and cycles during slow speeds (<10 cm/s). We found that, again, only tSC4 has higher mean force during object exploration, while the other tSCs are not significantly different. The working hypothesis admitted here is that if tSC4 is involved with encoding, we would expect to see a decrease in its strength during the test; more so, we would expect to see a decrease during exploration of the "old" object compared to the "new" (displaced) object. However, it was seen that no differences were detected for all tSCs. Therefore, due to research limitations and the need for adaptations related to the method of data collection presented, more detailed studies with larger sample size will be conducted so that the study is amenable to greater generalizations.

Keywords: object recognition memory; spatial memory; electrophysiological signals.

1. INTRODUÇÃO

A memória já é uma dentre as funções cognitivas com comprovada relevância para o desenvolvimento de habilidades e competências necessárias à adaptabilidade das espécies. A apreensão de suas características neurobiológicas, fornece direcionamento na investigação de uma gama de processos comportamentais relacionados a mesma. Dessa maneira, entre propostas de estudos promissores, a eletrofisiologia é uma possibilidade de investigar possíveis interações e/ou comunicações neuronais entre as regiões cerebrais, bem como as mútuas influências entre os sistemas cognitivos.

Hipóteses sobre a funcionalidade das propriedades elétricas neuronais e demais estruturas conectadas aos circuitos mnemônicos demandam investimentos científicos com maior rigor teórico e técnico, além de treinamentos específicos para o manejo de pesquisas laboratoriais clínicas e pré-clínicas (Peper & Markowitsch, 2001). Canolty e Knight (2010) e Hyafil et al. (2015) apontam a eletrofisiologia como um promissor campo de estudo, com elevado grau de análise, cujo surgimento é devido a compreensão de que diferentes frequências podem não somente coexistir, mas também, podem interagir de modo mútuo.

É nesta perspectiva que pesquisadores já constatarem a viabilidade existente em registrar disparos neuronais e potenciais de campo extracelular em várias regiões do cérebro e em diferentes espécies, podendo averiguar seu funcionamento rítmico através de análises espectrais. Para isso, são especificadas diferentes classificações identificadas nos registros: fase, frequência, formato de onda, origem do sinal e seu respectivo comportamento vinculado (Scheffer-Teixeira & Tort, 2018).

Deste modo, torna-se fundamental trazer que a função cognitiva memória tem em suas subdivisões a memória de reconhecimento, referenciada por sua grande relevância na preservação das espécies, visto que é entendida como a capacidade para discriminar um estímulo de outros previamente conhecidos, a exemplo de objetos, pessoas ou situações. Esta habilidade possibilita o reconhecimento de ameaças iminentes, dando suporte à previsão de episódios aversivos e modulando respostas comportamentais adequadas (Norman & O'Reilly, 2002).

Neste sentido, a tarefa de reconhecimento de objetos espaciais se apresenta como um excelente paradigma comportamental que permita investigar e estabelecer os diversos mecanismos neurais associados às distintas fases do processamento da memória, como a codificação, armazenamento, consolidação e evocação das memórias (Norman & O'Reilly, 2002; Maingret, Girardeau, Todorova, Goutierre & Zugaro, 2016).

Os testes de memória de reconhecimento têm sido amplamente estudados, discutidos e desenvolvidos no universo da pesquisa científica. Dados obtidos a partir das mesmas podem ser integrados ao entendimento das demais funções cognitivas e seus processos de comunicação neuronal adjacentes.

Seguindo esta perspectiva, a eletrofisiologia associada aos protocolos de reconhecimento, têm viabilizado a identificação e registro de como as células neuronais se comportam diante de tarefas planejadas para investigação da fase de codificação e evocação da memória em modelos animais. Torna-se possível, ainda, a realização de análises da dinâmica entre oscilações rápidas e lentas (ritmos teta-gama), cuja literatura atualmente disponível as direciona para modos de conectividade neuronal (Scheffer-Teixeira & Tort, 2018). É possível observar a relevância de testes que considerem os aspectos etológicos do modelo animal utilizado, trazendo menores possibilidades de enviesamento experimental, maior compreensão dos efeitos cognitivos associados à tarefa e suas respectivas alterações fisiológicas e/ou patológicas, devido à consistência da teoria associada e padronização bem fundamentada na tendência natural dos roedores (Ennaceur & Delacour, 1988).

As pesquisas citadas aqui, reiteram a relevância de testes que considerem fundamentalmente, a etologia do modelo animal utilizado. Tais testes consideram a consistência da teoria associada e possuem uma padronização bem fundamentada na tendência natural dos roedores (Ennaceur & Delacour, 1988).

A tarefa de reconhecimento de objetos espaciais, utilizada no protocolo experimental aqui proposto, promove a investigação da funcionalidade e possíveis interações com outras regiões associadas à memória. Dados imprescindíveis para maiores esclarecimentos sobre o modo como esta função cognitiva se integra, entre circuitos elétricos de áreas próximas e distantes.

É relevante trazer que a tarefa de reconhecimento se apresenta como um bom recurso para o estudo de declínios cognitivos e prejuízos na discriminação de padrões de alta e baixa interferência, características adaptativas para a sobrevivência das espécies ao longo da vida, a exemplo comportamentos como evitar o perigo, se alimentar, buscar abrigo, etc.

Nesta dissertação, os capítulos foram estruturados em uma sequência lógica que demonstrem a ligação entre os conceitos fundamentais para (1) a compreensão da memória e sua definição; (2) conceituação da memória de reconhecimento espacial de objetos, trazendo o protocolo comportamental clássico, o qual também foi utilizado nos dados analisados; (3) descrições gerais sobre as oscilações neuronais estudadas e, por fim, (4) a síntese da literatura que une eletrofisiologia e a subdivisão da memória estudada. Tendo como objetivo geral a

análise do acoplamento de frequência cruzada teta-gama durante uma tarefa de reconhecimento de objetos.

Como objetivos específicos foram: (1) estabelecer padrões de atividade oscilatória durante a fase de exploração e não exploração do objeto; (2) investigar o percentual de ciclos teta com gama médio durante a exploração de um objeto novo; (3) explorar o percentual de acoplamento teta com gama lento durante a evocação de um objeto familiar e (4) extrair e quantificar componentes espectrais da banda de frequência teta (tSCs) durante o comportamento exploratório do animal.

Na sequência foram apresentados os procedimentos metodológicos cujas análises eletrofisiológicas foram realizadas mediante a utilização do conjunto de dados *hc-25* gentilmente disponibilizado por Michaël Zugaro, intitulado como “Recordings and timed stimulation of rat dorsal hippocampal area CA1 and medial prefrontal cortex during behavior and sleep (disponível em <http://crcns.org/data-sets/hc/hc-25/>), tendo como artigo original, no qual seus dados foram utilizados pela primeira vez: “Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep” (Maingret, Girardeau, Todorova, Goutierre & Zugaro, 2016). O trabalho foi finalizado trazendo os resultados das análises eletrofisiológicas, juntamente com a articulação, discussão teórica e demais aspectos observados em todo o processo de experimentação.

2. SISTEMAS DE MEMÓRIA

Ao longo da trajetória acerca de como se configuram os mecanismos essenciais para o bom funcionamento da memória, avanços tecnológicos como registros eletrofisiológicos de regiões associadas à função cognitiva, têm viabilizado a realização de investigações sobre funções neuronais que ainda permanecem obscuras quanto à mecanismos de comunicação e conectividade neuronal.

A fim de abordar de modo estruturado as categorias mnemônicas, é válido distinguir as subdivisões da memória de longa duração. Tal categorização, baseada em divisões e funções específicas associadas a cada categoria, pode ser feita em: memória declarativa, ou memória explícita, e memória não declarativa, também conhecida como memória implícita. A memória declarativa consiste em memórias que estão disponíveis a serem acessadas à consciência, cuja evocação é possível através de palavras. Já a memória não declarativa, consistem em memórias que estão em níveis não tão acessíveis na consciência, não sendo comumente evocadas através de palavras, mas geralmente por ações (Ferbinteanu, 2019).

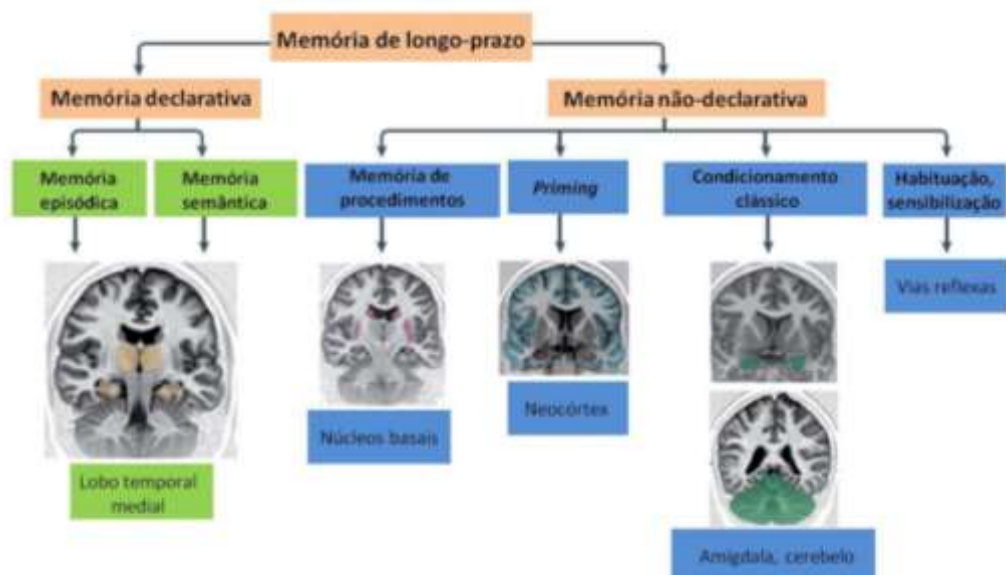


Figura 1: Sistemas de memória. Adaptado de Squire; Zola; (1996) e Lima (2011).

Sobre a caracterização da memória declarativa, pode-se depreender duas categorias: memória episódica, a qual se trata de experiências passadas, eventos ou episódios que apresentem os elementos deste tipo de memória: o quê, quando e onde. A memória episódica armazena informações associadas a episódios. A segunda categoria reconhecida trata-se da memória semântica, cuja caracterização envolve o conhecimento não associado a espaço e

tempo característico. É uma memória que aborda fatos, a exemplo do significado das palavras, símbolos, idiomas, conhecimento gerais sobre o mundo (Hill, 2010).

Moscovitch (2003) afirma que a região temporal medial seja uma das estruturas cerebrais primordiais na codificação e formação de novas memórias espaço-temporais. Indo mais além, o autor relata que a sua função esteja associada à integração e consolidação de informações sensoriais separadas. Os autores Squire e Zola-Morgan (1991, 1990) acrescentam ainda a transferência de informações recém-sintetizadas para estruturas neocorticais, a fim de adquirir propriedades de memória de longo prazo. Kandel (2000) corrobora sobre o processo de consolidação de memórias, que sua ocorrência se dá por intermédio do hipocampo, região filogeneticamente arcaica e bem delineada no lobo temporal medial (LTM).

Ferbinteanu (2019), ao mencionar as funções da memória para a sobrevivência, traz o conceito de aprendizagem, o processo de aquisição de novas informações que serão armazenadas na memória. Considera-se que através do mesmo há a possibilidade de orientar tanto o comportamento quanto o pensamento. O autor destaca a distinção entre a memória e a aprendizagem, afirmando que a memória é quem permite o processo de retenção de informações de modo seletivo, cuja evocação pode ser realizada sempre que desejado, de forma consciente ou até inconscientemente. Lent (2010) frisa que a memória pode ser visualizada como uma gama de processos neurobiológicos e neuropsicológicos que agem em conjunto.

As fases da memória são divididas em aquisição, consolidação e evocação. A aquisição se associa ao momento em que a informação chega até nosso sistema nervoso, por intermédio das estruturas sensoriais, as quais transportam a informação recebida até o cérebro. Na sequência, se segue o processo de consolidação, momento pelo qual a informação fica armazenada (Ferbinteanu, 2019).

É importante destacar que, após a conclusão do processo de retenção, a habilidade de iniciar de modo intencional o processo de evocação das memórias torna-se possível; em outras palavras, diz-se que se torna viável o retorno espontâneo ou voluntário das informações armazenadas. A evocação abarca a estruturação dos traços de memória seguindo uma ordem lógica no tempo (integração temporal), cuja ocorrência é dada primordialmente no córtex pré-frontal, mediante a memória de trabalho. É nesta perspectiva que podem ser caracterizados dois tipos de recuperação: o reconhecimento, foco do presente trabalho, e a recordação (Mourão & Melo, 2011). Os mesmos autores destacam que na memória de reconhecimento, o estímulo conhecido previamente e armazenado, suscita a sensação de familiaridade.

Além disso, quando fala-se em reconhecimento contextual, a capacidade do hipocampo em hospedar redes neuronais para navegação espacial e a memória episódica (Buzsáki & Moser, 2013). Células piramidais situadas no hipocampo têm campos receptivos espaciais chamados

de “campos de lugar” (Buzsáki e Moser, 2013, O'Keefe & Nadel, 1978), o que possibilita a representação da localização atual do animal através da taxa de disparo (Wilson & McNaughton, 1993).

O hipocampo trata-se de uma das unidades de processamento mais importantes do cérebro no que se refere à formação de novas memórias através do processamento de informações de tempo e espaço. Neste sentido, durante a exploração do ambiente, o hipocampo, juntamente com áreas associativas do córtex temporal medial, utilizam parâmetros sobre fatos passados (armazenado) e presentes (VanElzakker, Fevurly, Breindel, & Spencer, 2008). Na figura 2 ilustramos o hipocampo com suas divisões e circuitaria relacionada.

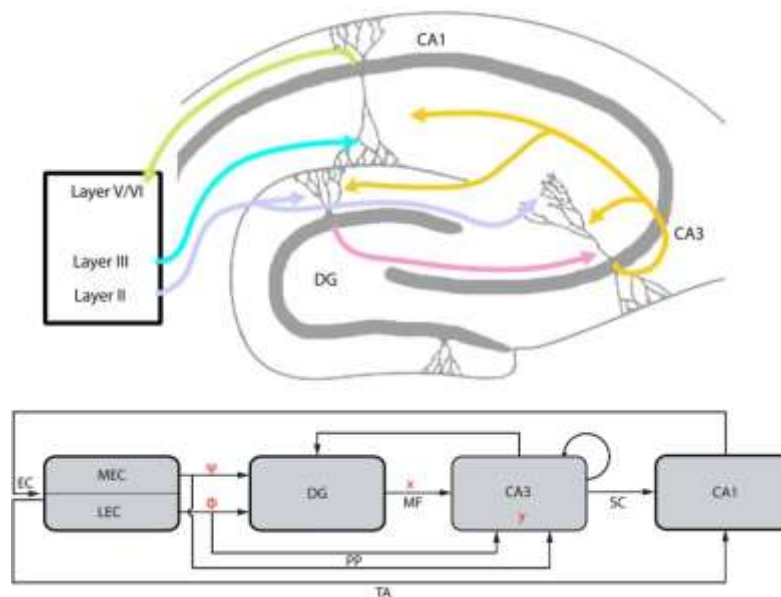


Figura 2: O hipocampo e suas conexões. Panagiotis C. Petrantonakis e Panayiota Poirazi, 2014.

De modo mais detalhado, o hipocampo propriamente dito é composto pelos campos do giro dentado (DG) e cornu ammonis (CA1-CA3), sendo seu circuito de informações sensoriais, recebidos do córtex entorrinal (CE) de forma uni e polimodal. Neurônios em camadas superficiais de CE recebem essa entrada e projetam-se através da camada II para a camada molecular de DG, os quais fazem sinapses com os dendritos das células granulares, como exibido na Figura 2. As células granulares, por sua vez, projetam por intermédio das fibras musgosas até as células piramidais de CA3. As células piramidais de CA3 então se projetam para células piramidais de CA1 pelas colaterais Schaffer. Finalizando a alça as células piramidais de CA1 dão origem a projeções que terminam no subículo e nas camadas profundas de CE (camadas IV / V). O CE então envia as projeções de volta às regiões corticais originárias. Outro grupo de neurônios se projeta da CE (camada III) diretamente para os dendritos apicais distais em CA1 como via temporoamônica (Vago; Wallenstein; Morris, 2017).

Além de ser uma área fundamental para a memória espacial e episódica (Squire, et al., 2004), o hipocampo é uma região crucial para a análise e compreensão dos ritmos cerebrais. Colgin (2016) ratifica trazendo que o hipocampo possui neurônios compactados de forma densa que geram grandes LFPs, os quais provocam grandes ritmos, aspecto característico principalmente para a área CA1, por conta dos dendritos associados em paralelo que, tem suas correntes sinápticas seguindo na mesma direção, somando-se a fim de produzir sinais cuja amplitude tem maior facilidade de serem detectados em registros de LFP.

A seguir, os tópicos seguintes abordam uma síntese dos processos eletrofisiológicos envolvidos nas áreas de processamento mnemônico apresentados na literatura, cujo detalhamento proporciona o entendimento da pesquisa aqui relatada.

3. SINAIS ELETROFISIOLÓGICOS

O estudo da atividade elétrica cerebral objetiva registrar e quantificar flutuações rítmicas, realizando análises das propriedades oscilatórias (Figura 03), que possibilitam a associação com a atividade individual dos neurônios contidos na região. A atividade rítmica expressa no nível extracelular cerebral está atrelada à flutuação do potencial de campo local decorrente da atividade neuronal localizada proximamente ao eletrodo implantado, percebida na diferença de potencial elétrico (microvolts) (Buzsaki et al., 2012).

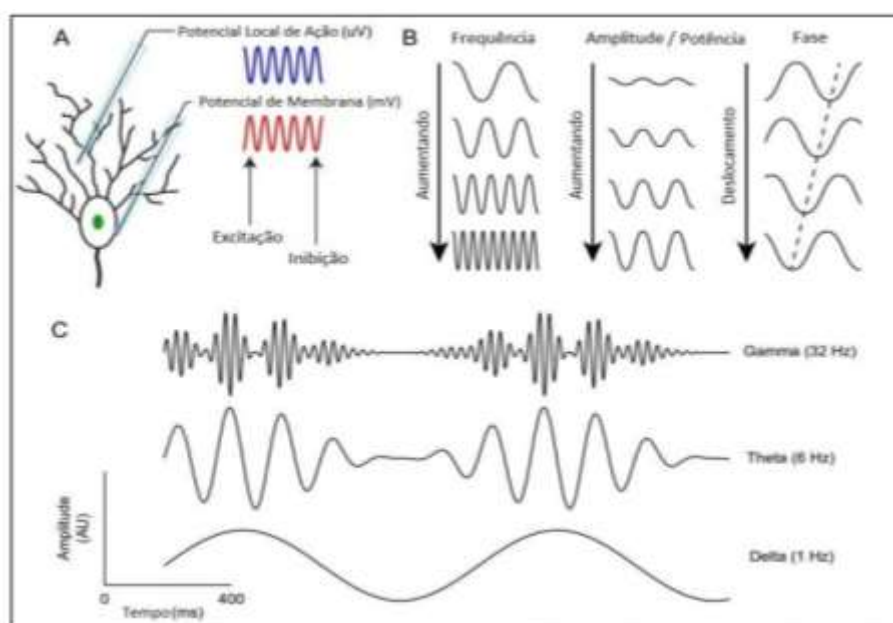


Figura 3: Propriedades neurais oscilatórias. (A) Local de origem das oscilações (B) Propriedades dos ritmos: Frequência, potência e fase. (C) hierarquia das oscilações. Simon & Wallace (2016).

Em se tratando dos ritmos neuronais, a faixa de 4–12 Hz, mais proeminente durante comportamento de exploração dos animais e sono REM, são denominadas oscilações teta (Buzsáki 2002). Oscilações mais rápidas aparecem acopladas a ondas tetas e são denominadas ritmos gama (30–100 Hz) e oscilações de alta frequência (HFOs; 120–160 Hz) (Scheffer-Teixeira & Tort, 2018).

Essas ondas de atividade ocorrem em muitas regiões corticais e subcorticais. Teta de alta amplitude é prontamente observada durante os comportamentos locomotores. Adicionalmente, os autores Jezek (2011) e Dupret (2013) afirmam que cada ciclo de teta pode constituir uma unidade essencial de informação no interior de uma memória episódica. Os mesmos autores frisam que o suporte a esta ideia foi dado a partir de pesquisas com ratos,

apresentando que diferentes representações de contextos, ou até do mesmo, porém com localizações de recompensas modificadas, foram segregados em ciclos teta destacados. Scheffer-Teixeira e Tort (2017) discriminaram diferentes bandas de frequência filtradas na faixa de teta-gama nas regiões hipocampais e no córtex parietal. Estes estudos apresentaram análises eletrofisiológicas identificando acoplamentos fase-amplitude, coerência, análises espectrais, entre outras formas que apontam modos de comunicação neural em processos mnemônicos.

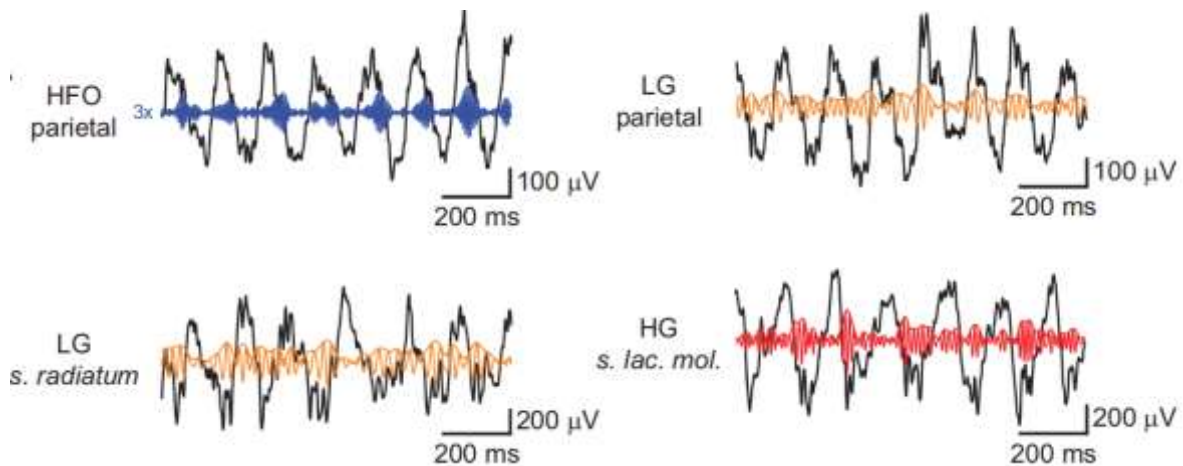


Figura 4: Sinal bruto de LFP com oscilações neuronais filtradas. Theta: 4 - 12Hz, Low Gamma (LG): 30 - 60 Hz, High Gamma (HG): 60 - 100 Hz, High Frequency Oscillations (HFO): 120 - 160 Hz em regiões hipocampais e Córtex Parietal Posterior. Scheffer-Teixeira & Tort, 2017.

Na região do hipocampo, o ritmo gama apresenta maior amplitude no momento em que teta está no seu vale, o que aponta um funcionamento sistêmico funcional comum (Bragin et al., 1995; Buzsáki, Leung 1983). Bragin et al. (1995) mencionam experimentos que demonstraram que as variações da frequência dos ritmos gama e teta tem correlação, cuja evidência de uma inter-relação funcional é provável. A variação da frequência das oscilações gama e teta estão correlacionadas, o que provê adicional evidência de sua inter-relação funcional (Bragin et al., 1995). Através de registros de potencial de campo local, Colgin et al. (2009) apontaram que, em CA1, diferentes oscilações gama co-ocorrem no decorrer do ritmo teta. Schomburg et al. (2014) enfatizaram a identificação de que as redes de entrada entorhinal e CA3 originam oscilações gama médias e lentas respectivamente; no entanto, as oscilações gama rápidas são geradas por redes CA1 de interneurônios e células piramidais. A figura 5 demonstra o formato dessa circuitaria.

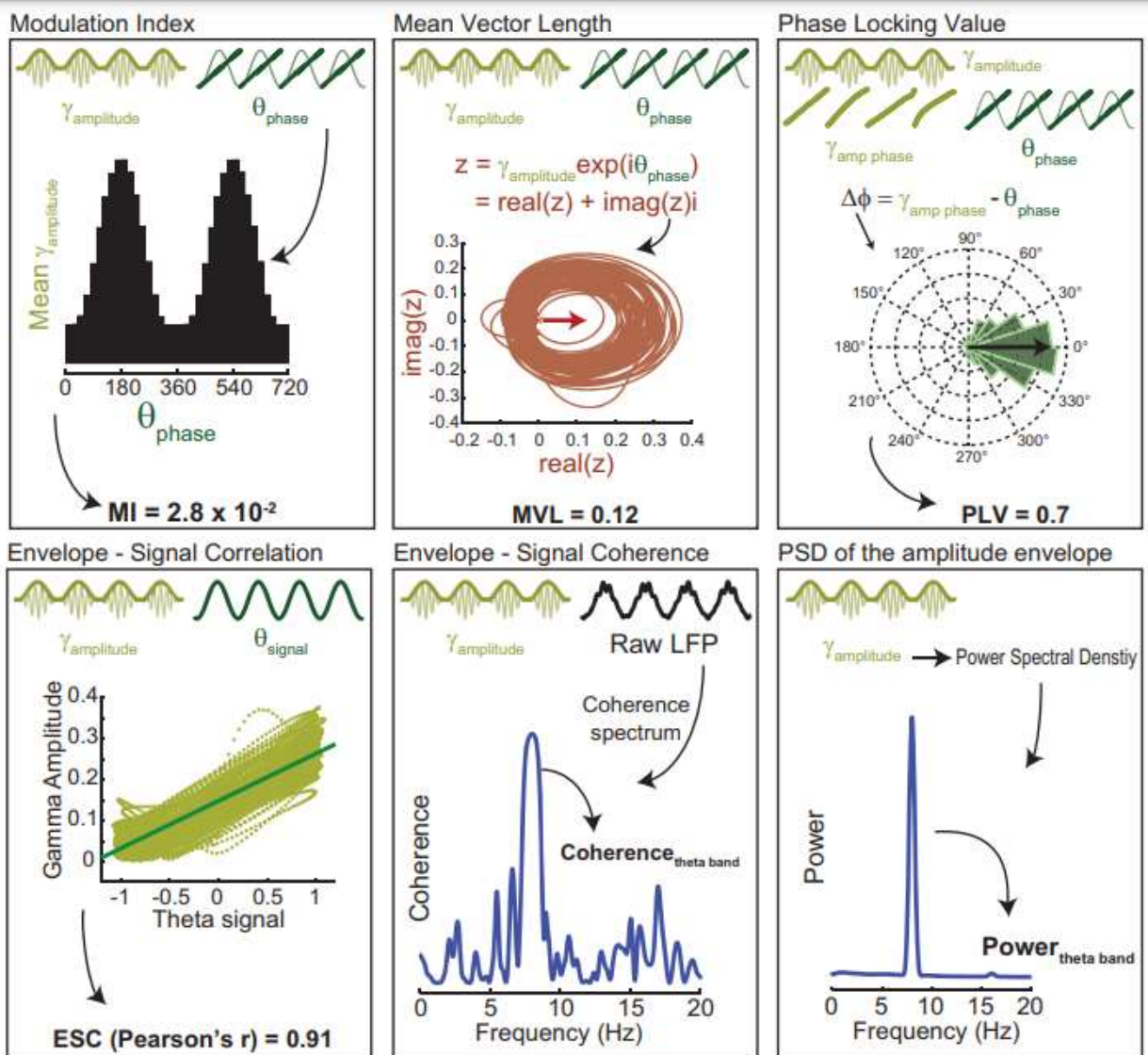


Figura 7. Diferentes medidas para análise de acoplamento fase-amplitude. (Scheffer-Teixeira & Tort, 2018).

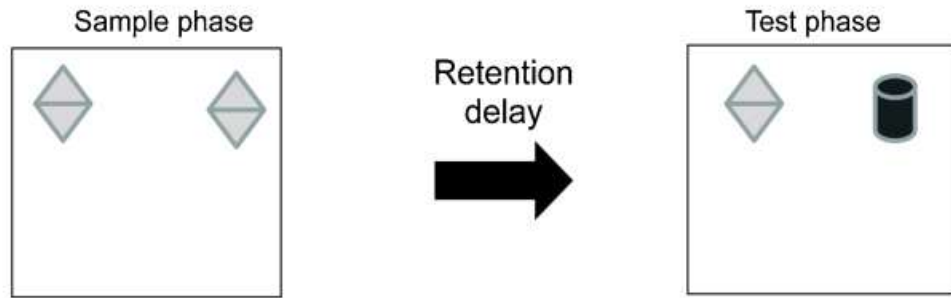
Neste estudo foi destacada a relação, em termos de atividade síncrona, das oscilações neuronais vistas no hipocampo durante uma tarefa de reconhecimento de espacial de objetos, a qual será melhor detalhada no tópico seguinte.

4. O PARADIGMA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.

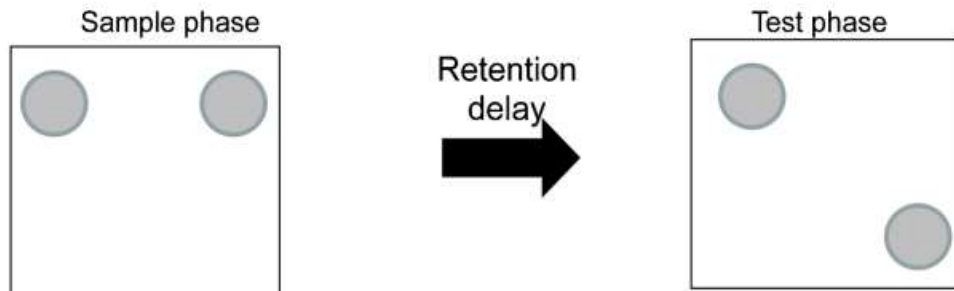
A utilização das bases etológicas no desenvolvimento de protocolos experimentais com roedores se apresenta como primordial tanto para a estruturação da tarefa comportamental, quanto para suas posteriores interpretações. De acordo com Ennaceur & Delacour (1988); Munby (2002) a tendência natural de roedores é a exploração por mais tempo de objetos novos do que objetos familiares, o que permite utilizá-la como parâmetro de reconhecimento de objetos. De modo similar, a tendência de roedores também se estende a preferência exploratória por objetos deslocados, o representa um índice de memória de local, bem como expressam preferência por objetos familiares em contextos que diferem dos originalmente encontrados, configuração que os tornariam novidade e conseqüentemente um índice de memória de contexto.

Dessa maneira, foi ilustrado na figura 8 quatro procedimentos de memória de reconhecimento cujo critério de escolha entre elas, está relacionado com os aspectos específicos deste tipo de memória. São elas: (a) *preferência por objeto novo (OR)*, a exploração de um objeto novo pelos ratos é comparada com a de um objeto familiar; (b) *localização do objeto (OL)*, que testa a capacidade dos animais de detectar o movimento de um objeto familiar para um novo local; (c) *objeto no local (OiP)*, investiga a diferenciação feita entre objetos familiares e aqueles que estão recentemente associados a lugares específicos; (d) *ordem temporal (TO)*, avalia a acurácia em discriminar objetos familiares apresentados em momentos diferentes (Warburton & Brown, 2015).

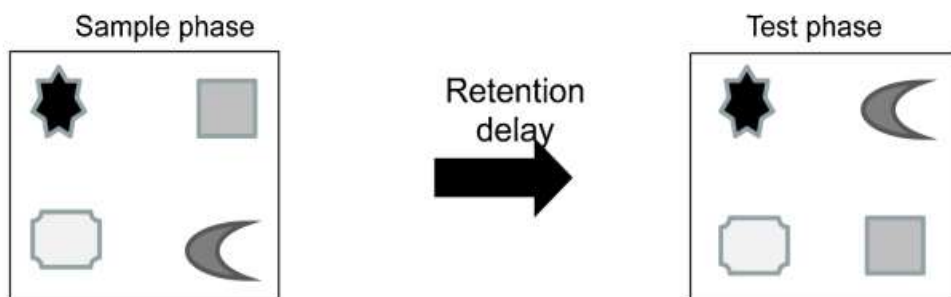
A. Object Recognition



B. Object Location



C. Object-in-place



D. Temporal Order

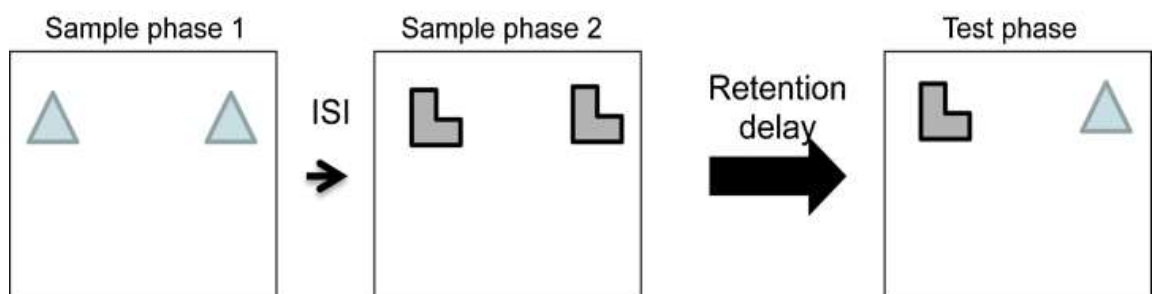


Figura 8. Diagrama das quatro tarefas de memória de reconhecimento de objetos. (A) Tarefa de preferência de objeto novo, (B) tarefa de localização de objeto, (C) tarefa de objeto no local, (D) tarefa de ordem temporal. Extraído de Warburton e Brown (2015).

No protocolo de reconhecimento espacial de objetos, dois objetos iguais e familiares são exibidos durante o ensaio de teste, tendo sido um dos objetos deslocado. Nesta tarefa, os animais tendem a se direcionar para o objeto movido. Em outras palavras, o objeto "antigo familiar" tem preferência sobre o objeto "familiar recente", supondo que os objetos explorados anteriormente sejam reconhecidos (Ennaceur & Delacour, 1988). Ennaceur, Neave, & Aggleton (1997) e Mitchell & Laiacina (1998) ratificam que este índice representa a capacidade em discriminar a recência relacionada às diferentes informações apresentadas.

Para O'Reilly & Norman (2002) quando os estímulos são apresentados, o hipocampo produz representações relativamente não sobrepostas (separadas por padrão) na região CA3 (figura 9), a qual tem a separação do padrão facilitada pelo giro dentado (DG). Os mesmos autores apontam para a existência de uma ligação entre as unidades ativas em CA3 e a presença de um modo de re-representação do padrão de entrada na região CA1. Uma re-exibição parcial do padrão previamente estudado conduz a construção da representação CA3 original completa, em outras palavras, a 'conclusão do padrão'. Em seguida, conclui-se a reconstrução do padrão estudado na camada de saída (em seguida, no córtex) via CA1 (O'Reilly & Norman, 2002).

Na figura 9 foi ilustrado em formato esquemático como o hipocampo aprende utilizando representações distintas para codificar detalhes específicos dos eventos enquanto minimiza a interferência.

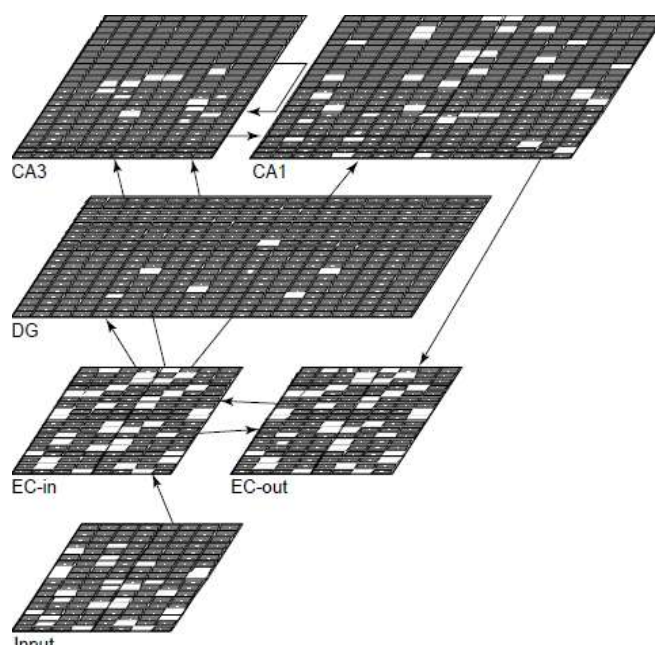


Figura 9. Esquema de processamento de informações no hipocampo. Feitas a partir da separação de padrões. Extraído de O'Reilly e Norman (2002).

Juntos, esses resultados estabeleceram que tanto a memória de reconhecimento de objeto no local quanto a de ordem temporal necessitam de um circuito de interações entre o córtex pré-frontal medial hipocampal-peririnal (figura 10). Essas interações são apoiadas por evidências anatômicas visto que o córtex pré-frontal medial recebe uma projeção direta do hipocampo e da DM, e está reciprocamente conectado com o córtex perirrinal (Beckstead,1979; Delatour; Witter, 2002). Além disso, o hipocampo está conectado ao córtex perirrinal diretamente através de CA1 e indiretamente por meio do córtex entorrinal (Witter,1993). Na sequência, a região CA1 do hipocampo se projeta de volta para o córtex perirrinal (Agster & Burwell, 2013).

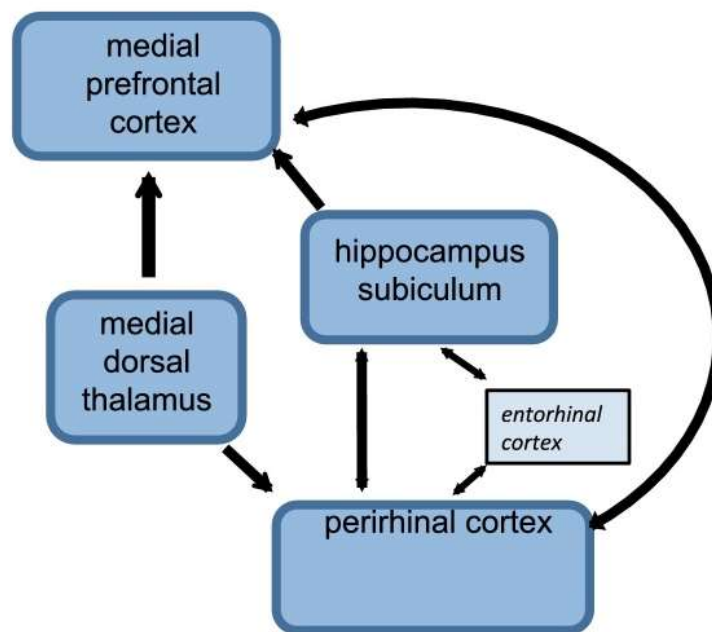


Figura 10. Circuito de interações entre o córtex pré-frontal medial hipocampal-peririnal. (Warburton & Brown, 2015)

Destarte, Manns e Eichenbaum (2009) constataram mediante suas pesquisas que tanto as características do objeto quanto a sua localização, processada de acordo com o padrão de atividade hipocampal, refere-se à tarefa de memória de reconhecimento. Segundo os autores a reprodução da localização de um objeto aumentava a riqueza de informações sobre a identidade do objeto, enquanto posicioná-lo de modo diferente ocasionava em uma diminuição das informações sobre a localização do objeto.

5. PROCESSOS MNEMÔNICOS E ELETROFISIOLOGIA

São muitos os questionamentos relacionados à funcionalidade das variações e acoplamentos rítmicos. Aqui foram sintetizadas algumas informações sobre as oscilações presentes durante o processamento da memória, seguindo questionamentos e hipóteses já presentes na literatura.

Squire (1991) e Eichenbaum (2004) ratificam a substancial importância do funcionamento do hipocampo na formação da memória e processos subjacentes, como habilidades referentes à navegação espacial (O'Keefe & Nadel, 1978), discriminação de contexto (Mizumori et al., 2007; Tort et al., 2011) e detecção de novidades (Knight, 1996; Lisman & Otmakhova, 2001; Kumaran & Maguire, 2007; Duncan et al., 2012).

Nesta perspectiva, autores têm apontado para a hipótese de que as oscilações teta coordenem as redes neurais durante a codificação da memória de modo interno e mediante integração de diferentes áreas (Benchenane et al., 2011; Colgin, 2015; Tort et al., 2009). Pesquisas investigam e apontam para uma estreita relação entre o hipocampo e áreas pré-frontais mediais, quando se trata de codificação e evocação da memória. Estes estudos destacam seu importante papel mediador na função dessas duas áreas (Benchenane et al., 2011; Ihb, 2019).

De acordo com Buzsáki & Draguhn (2004) e Fries (2005) a coordenação de diferentes regiões do cérebro no decorrer das operações mnemônicas necessárias na detecção das novidades seria viabilizada pelo papel observado na ocorrência das oscilações rítmicas no decorrer integração e estruturação das informações.

Por conseguinte, a força do acoplamento teta-gama em CA3 (Figura 11) aumenta à medida que os animais aprendem e se correlaciona fortemente com o crescimento da precisão do desempenho associado ao aprendizado. Estes dados corroboram com as hipóteses que apontam para uma função essencial contida na interação teta-gama durante a codificação da informação (Tort; et al., 2009).

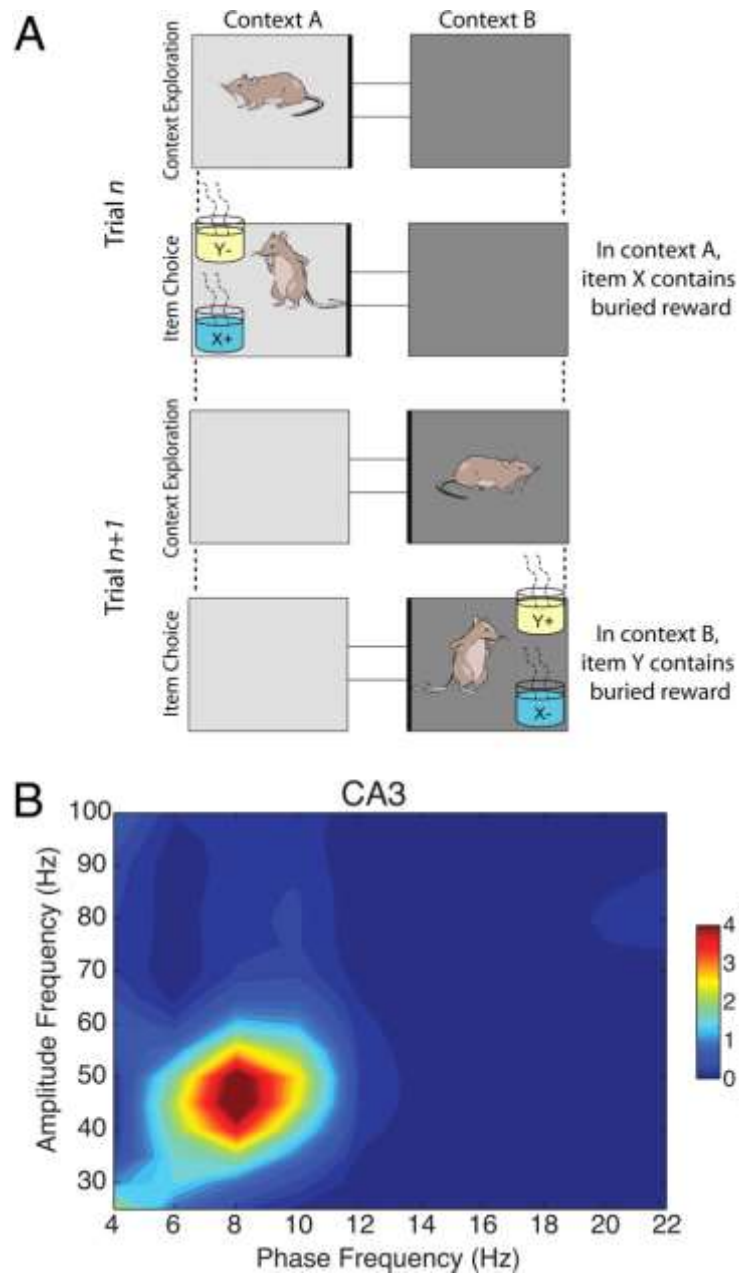


Figura 11. A fase teta modula a amplitude LG em CA3 hipocampal. Extraído de Tort; et al., (2009).

Os capítulos subsequentes tratam-se do detalhamento da pesquisa aqui relatada. Os mesmos trazem todo o protocolo experimental, seus enfoques e resultados juntamente com a discussão do que foi obtido.

6. METODOLOGIA

6.1 Aquisição de dados

Os registros eletrofisiológicos utilizados para analisar o acoplamento de frequência cruzada teta-gama durante uma tarefa de reconhecimento, foram coletados no CRCNS.org, banco de dados com formato de rede colaborativa no qual pesquisadores de diferentes laboratórios disponibilizam *datasets* de toda a fase experimental.

De modo simplificado, a tabela 01 apresenta uma síntese descritiva das etapas metodológicas do experimento base para as investigações e análises obtidas nesta pesquisa. Utilizamos o conjunto de dados *hc-25* gentilmente disponibilizado por Michaël Zugaro: “*Recordings and timed stimulation of rat dorsal hippocampal area CA1 and medial prefrontal cortex during behavior and sleep* (disponível em <http://crcns.org/data-sets/hc/hc-25/>). Já o artigo original em que os dados foram utilizados pela primeira vez, em 2016, intitula-se: “*Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep*” (Maingret, Girardeau, Todorova, Goutierre & Zugaro, 2016). Note que nesta tabela mostramos apenas a metodologia empregada pelos autores do *dataset* e que se mostra relevante para a nossa investigação. Uma parte central do trabalho do grupo do Dr. Zugaro é demonstrar que uma estimulação elétrica realizada durante a ocorrência sincrônica de *sharp-wave ripples* (SPW-R) no hipocampo e *delta-spindles* no córtex pré-frontal está correlacionada a um aumento do índice de discriminação dos objetos no teste; sem esta estimulação (ou usando uma estimulação controle), os ratos normalmente não apresentam um índice de discriminação de objetos acima de 50% após 24 horas (trabalhos com exploração de objetos via de regra usam 15 minutos como tempo entre treino e teste).

Na sequência será apresentada a metodologia utilizada no desenvolvimento das investigações realizadas no decorrer da presente pesquisa, especificando as análises eletrofisiológicas realizadas.

Tabela 01: Síntese metodológica dos dados utilizados

Animais	Um total de 9 ratos machos da linhagem <i>long evans</i> (rené janvier; peso: 280-350 g) foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas: 12 horas (luzes acesas às 07:00 da manhã). Os experimentos ocorreram durante o dia. Os ratos foram alojados em grupos até 1 semana antes da cirurgia.
----------------	--

	<p>Todos os experimentos foram realizados de acordo com os padrões institucionais (comitê operacional do cnrs para a ciência da vida) e internacionais (diretrizes do instituto nacional de saúde dos eua), regulamentos legais e requisitos éticos sobre o uso e o cuidado de animais.</p>
Cirurgia	<p>Os sinais eletrofisiológicos foram adquiridos usando tetrodos. Os ratos foram anestesiados profundamente (xilazina, 0,1 ml intramuscular; pentobarbital, 40 mg por kg de peso corporal, intraperitoneal; 0,1 ml de pentobarbital suplementado a cada hora) e implantados com um <i>microdrive</i> personalizado, permitindo o ajuste de a 16 tetrodos individuais. Os ratos foram implantados com 16 tetrodos direcionados para as regiões pré-límbica e infralímbica do mPFC direito e o subcampo CA1 do hipocampo direito. A presente investigação focou-se na análise dos sinais hipocampais; todavia, realizaremos a inclusão do mPFC nos trabalhos futuros. Para realizar a estimulação, um eletrodo bipolar customizado, composto por dois fios de aço inoxidável foi implantado no neocórtex. Parafusos em miniatura de aço inoxidável (referência e terra) foram implantados acima do cerebelo. Durante a recuperação da cirurgia (mínimo 3 dias), os ratos receberam comida e água <i>ad libitum</i>. Os eletrodos de gravação foram abaixados progressivamente até atingirem seus objetivos e então ajustados todos os dias para otimizar o rendimento e a estabilidade.</p>
	<p>Todas as sessões de treinamento e gravação ocorreram em uma sala de baixa iluminação. O comportamento foi monitorado usando uma câmera de vídeo aérea posicionada acima do aparato. Um diodo emissor de luz vermelha (LED) foi fixado na frente do <i>microdrive</i> para rastrear a posição instantânea do animal. Para sessões de descanso e sono, os ratos foram isolados em uma arena familiar do tipo “vaso de flores” no centro da arena de gravação.</p>
	<p>Todos os experimentos (sessões de comportamento e sono) foram realizados em uma área pouco iluminada, fechada por cortinas escuras.</p> <p>Uma arena de 70 cm × 50 cm com paredes plásticas pretas de 50 cm de altura foi usada para a tarefa comportamental. Um cartão branco (20 × 30 cm) em uma parede serviu como pista visual de referência. Durante a fase de habituação, os ratos foram autorizados a explorar livremente a arena vazia por 20 minutos, uma vez ao dia, durante 3 dias consecutivos.</p> <p>A tarefa de reconhecimento de objetos espaciais teve duas fases, codificação e recuperação, separadas por um intervalo de ~ 24 horas. Ambas as fases ocorreram na mesma hora do dia (Figura 14).</p>

	<p>Durante a fase de codificação, dois objetos idênticos foram colocados em dois cantos adjacentes. Os ratos foram liberados no centro da arena e permitidos explorar por 3 minutos. Este treinamento com tempo limitado tinha como objetivo impedir a recuperação da configuração espacial dos objetos no dia seguinte.</p> <p>Os ratos foram então colocados em uma arena cilíndrica do tipo “vaso de flores”, com pouca possibilidade de locomoção, para sessões de sono que duraram até que 1.000 estímulos fossem realizados e depois retornaram à sua gaiola.</p> <p>A fase de recuperação ocorreu no dia seguinte. Um dos objetos foi deslocado para o canto oposto e os animais foram autorizados a explorar livremente a arena por 5 minutos.</p> <p>Os mesmos ratos ($n = 9$) foram submetidos à estimulação: realizaram a tarefa duas vezes (com objetos diferentes), em ordem pseudo-aleatória, com intervalo de pelo menos dois dias entre tarefas.</p> <p>O índice de discriminação foi definido como o tempo gasto na exploração do objeto deslocado dividido pelo tempo total de exploração dos dois objetos.</p> <p>Considerou-se que os ratos exploravam um objeto sempre que sua cabeça estava orientada e localizada a 2 cm do objeto.</p>
Processamento de dados e classificação de disparos	<p>Um LED vermelho foi usado para rastrear a posição instantânea dos animais</p> <p>Os dados neurofisiológicos e comportamentais foram explorados usando o NeuroScope (L. Hazan, http://neurosuite.sourceforge.net). Os sinais de LFP foram extraídos dos sinais de banda larga ao reduzir a amostragem de todos os canais para 1.250 Hz.</p>
Análise de dados estatística	<p>Os dados foram analisados usando Matlab (Statistical Toolbox; FMAToolbox, M.Z., http://fmatoolbox.sourceforge.net). Testes estatísticos foram não paramétricos e bicaudais.</p> <p>Para detecção <i>offline</i> do SPW-R, o LFP gravado na camada piramidal CA1 foi filtrado entre 150 e 250 Hz. Após, foi tomado o quadrado, filtrado por um passa-baixa e normalizado. SPW-Rs foram definidos como eventos em que o sinal permaneceu acima de um limiar de 2 (unidade arbitrária) entre 30 ms e 100 ms e atingiu o pico em pelo menos 5.</p> <p>Para detectar ondas delta, o LFP registrado no mPFC foi filtrado (0–6 Hz) e transformado por z-score. Após, foram extraídas sequências de começo, pico e fim das ondas delta. Sequências com duração</p>

	<p>inferior a 150 ms ou superior a 500 ms foram descartadas. Para a detecção dos fusos (<i>spindles</i>), o LFP gravado no mPFC foi filtrado por passa-banda (9–17 Hz) e normalizado por z-score. Após, foi realizada a transformada de Hilbert e a magnitude do sinal analítico foi elevada ao quadrado. Por fim, o sinal foi suavizado usando uma janela Gaussiana de 100 ms.</p> <p>As sequências delta-fuso foram definidas como épocas em que os picos do fuso ocorreram entre 100 ms e 1,3 s após os picos delta. As sequências SPW-R – delta correspondiam a épocas em que os picos delta ocorriam entre 50 ms e 250 ms após os picos das ripples. As sequências SPW-R – delta-fuso corresponderam à conjunção desses eventos. As sequências Delta – SPW-R corresponderam a ocorrências de picos de ondulação entre 50 ms e 400 ms após os picos delta.</p>
Histologia	<p>No final dos experimentos, lesões eletrolíticas foram feitas na ponta dos eletrodos para verificar sua localização precisa (camada piramidal CA1 e camadas profundas do mPFC pré-límbico). Os ratos foram anestesiados profundamente com uma dose letal de pentobarbital e perfundidos intracardialmente com solução salina (0,9%, p / vol), seguidos por 400 ml de paraformaldeído (10%, p / vol). Os cérebros foram então cortados em seções coronais (40 μm) e corados com cresil-violeta.</p>

Fonte: (N. Maingret, Todorova R. & M. Zugaro, 2019).

6.2 Análise de dados eletrofisiológicos

A fim de realizar as análises de sinais de LFPs (*local field potential*), registrados no experimento supracitado, utilizamos rotinas escritas em linguagem MATLAB (*MathWorks*, Natick, MA) personalizadas pelo grupo do Laboratório de Estudos em Comportamento e Cognição (LEMCOG). Aqui, foram analisados registros de LFP durante os períodos de exploração de objetos de um total de 9 ratos.

6.3 Filtro, obtenção de fase e amplitude

Um filtro de resposta a impulso linear foi utilizado através da função *eegfilt* obtido do EEGLAB para viabilizar a filtragem das frequências. A função *eegfilt* possibilita a aplicação de um filtro que vá em direções opostas – frente e trás – cuja vantagem assegura que atrasos de fase inseridos pelo filtro sejam desconsiderados.

Assim também, a função *firls* foi usada como filtro de resposta ao impulso finita (FIR) de fase linear por estimação através do método dos mínimos quadrados. A transformada de

Hilbert foi utilizada para se obter o sinal analítico e possibilitar a extração das fases e amplitudes do sinal filtrado (função *hilbert* do *Signal Processing Toolbox*). A transformada de *Hilbert* impõe no sinal de entrada uma rotação de 90° . Este sinal girado pela transformada conjuntamente o sinal original compõem o sinal analítico (a saída da função *hilbert* já é o sinal analítico). E a partir *do ângulo e da amplitude da representação polar* deste sinal analítico, foram obtidos a fase e o envelope de amplitude da oscilação.

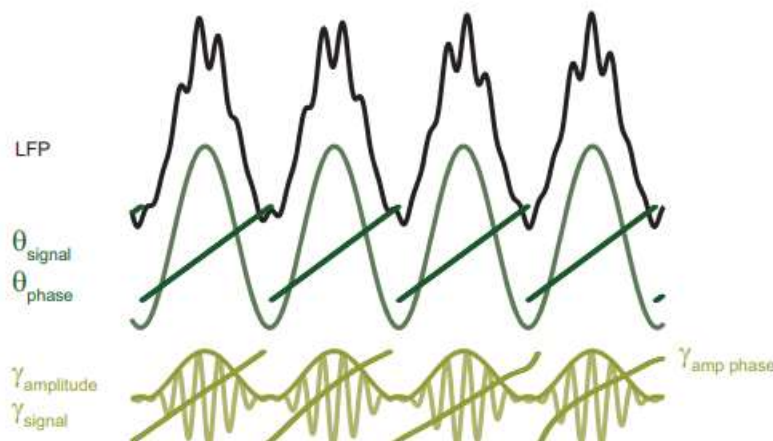


Figura 12. Obtenção de fase e amplitude. Extraído de Scheffer-Teixeira & Tort (2017).

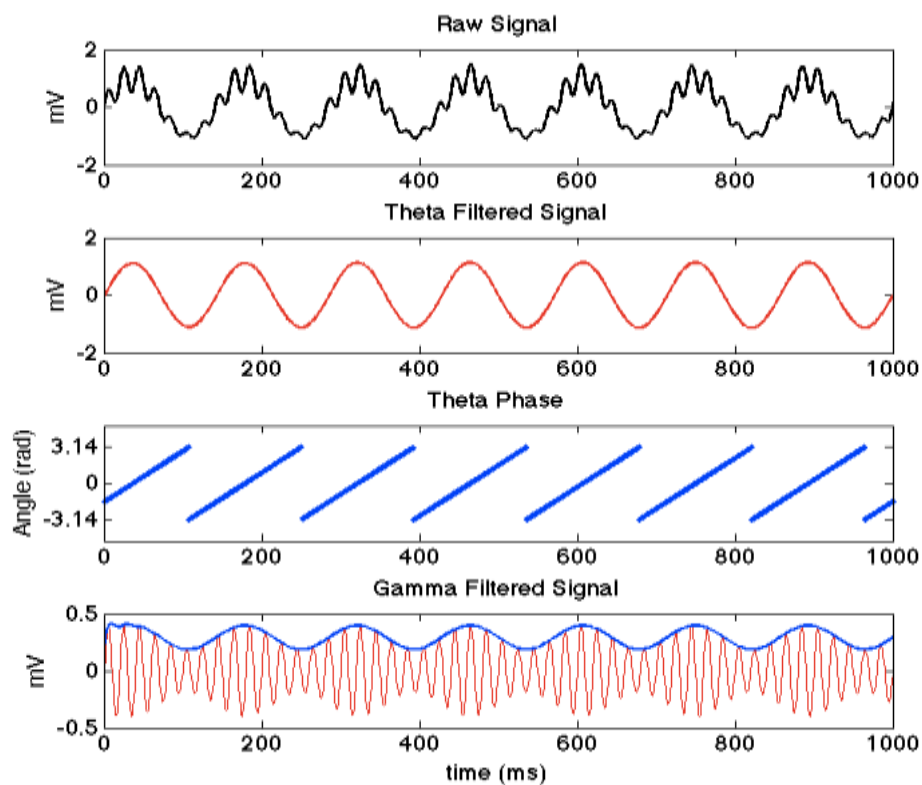


Figura 13. Sinal bruto de LFP filtrado na frequência teta. Fase de teta acoplada ao sinal de gama filtrado. Extraído de Scheffer-Teixeira & Tort (2017).

6.4 Análise espectral

O método de periodograma de Welch, utilizado por meio da função *pwelch* do *Signal Processing Toolbox* (50% de sobreposição de janelas de Hamming com um comprimento de 4 segundos) foi o modo como o espectro de potência foi estimado. As decomposições espectrais tempo-frequência foram obtidas usando a função *spectrogram* do *Signal Processing Toolbox* (janela de 2 segundos, 50% de sobreposição) e por transformada de *Wavelet* usando um conjunto de *wavelets* do tipo Morlet imaginária.

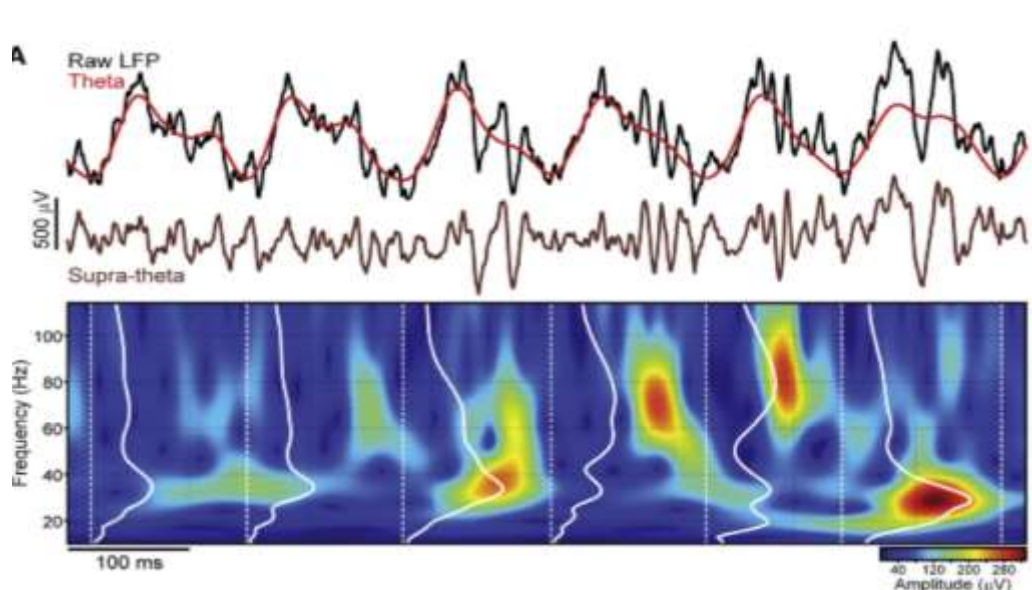


Figura 14. Espectrograma. Extraído de Lopes-dos-Santos (2018).

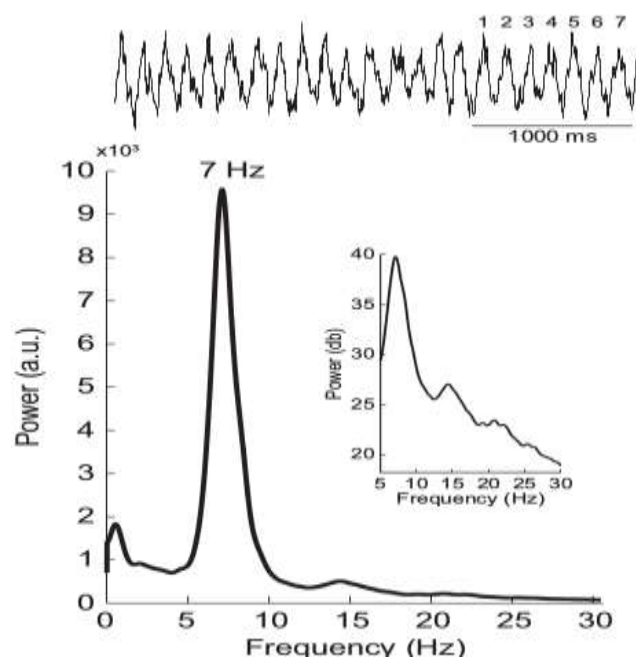


Figura 15. Análise espectral. Extraído de Scheffer-Teixeira & Tort (2017)

6.5 Acoplamento fase-amplitude

Para avaliar o acoplamento fase-amplitude usaremos o Índice de Modulação (*Modulation Index, MI*) conjuntamente com a criação de comodulogramas (Tort et al. 2009). O MI mede a força do acoplamento entre duas faixas de frequência de interesse: uma frequência lenta cuja fase é modulatória e uma outra mais rápida cuja amplitude é modulada. Brevemente, o MI é obtido como se segue: as fases da frequência lenta são divididas em janelas de 20° e a amplitude média da frequência rápida associada a cada janela é então computada; a amplitude média é subsequentemente normalizada pela divisão de cada valor da janela pela soma de todas as janelas, criando assim uma função de distribuição fase-amplitude. Uma distribuição uniforme de fase-amplitude significa que a amplitude é, na média, a mesma para todas as janelas de fase, o que ocorre na ausência de acoplamento fase-amplitude. Quanto maior o acoplamento, maior o afastamento que a distribuição fase-amplitude apresenta da distribuição uniforme. A distância entre a distribuição fase-amplitude empírica (P) e a distribuição uniforme (U) calculadas usando KL- distance é chamada de Índice de Modulação: quanto mais próximo de 1, maior a modulação.

Para obter o comodulograma, o MI foi gerado para diversos pares de bandas de frequências rápidas e lentas, e os valores do MI foram expressos em um gráfico bidimensional. As bandas de frequência são sinais com filtragem estreita (largura de banda para as frequências de fase: 4 Hz; largura de banda para as frequências de amplitude: 10 Hz) e cada coordenada no comodulograma representa a frequência central. Para melhor comparação entre frequências, as amplitudes foram padronizadas por *zscore* para corrigir a flutuação $1/f$ que ocorre naturalmente com as ondas cerebrais.

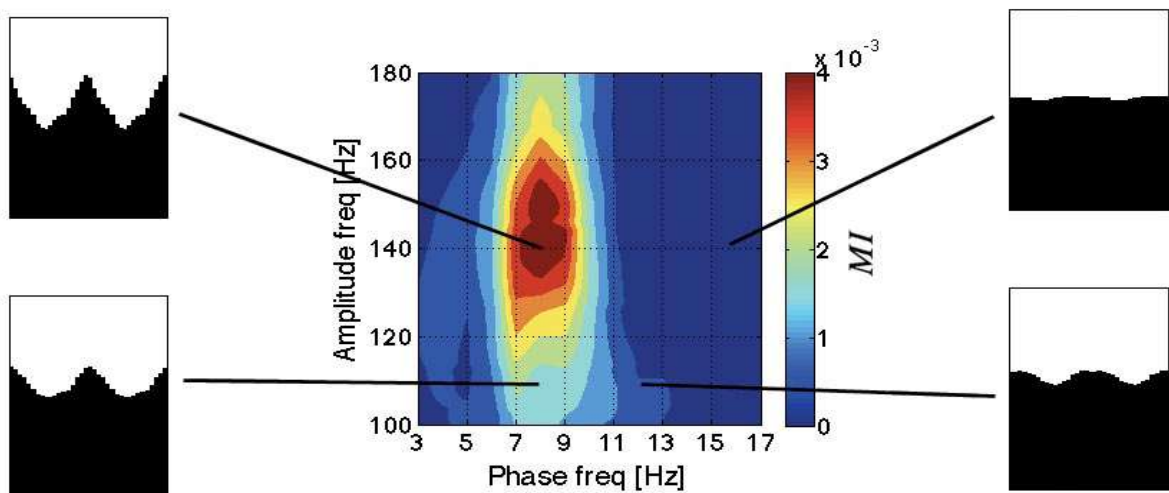


Figura 16. Comodulograma. Informações de frequência da fase de teta, acoplada a amplitude de oscilações mais rápidas. Esquema de cores montado de acordo com o MI encontrado. (Tort, et al.; 2008)

6.6 Decomposição não supervisionada de potenciais de campo locais (LFPS)

Utilizamos o método de Decomposição em Modos Empíricos (*empirical mode decomposition – EMD*) para a extração dos sinais neurais brutos de LFP em diversas bandas de frequência. O EMD realiza uma série de iterações no sinal a fim de decompô-lo em sinais fundamentais cuja soma reconstrói o sinal original. Resumidamente, o processo do EMD:

- (1) identifica os extremos (picos e vales) do sinal bruto;
- (2) realiza duas interpolações não-lineares por *spline* cúbico entre os pontos extremos (picos e vales separadamente), criando dois envelopes, um superior e outro inferior;
- (3) obtém a média entre os envelopes;
- (4) esta média é retirada do sinal bruto original e a resultante é a primeira função de modo intrínseco (*intrinsic mode function - IMF*);
- (5) este processo, chamado de *sifting*, é então repetido algumas vezes utilizando o IMF gerado ao invés do sinal bruto; a cada iteração, todavia, o IMF é sempre atualizado;
- (6) após um critério de parada, o IMF final é então mantido e alocado como o IMF_1 .
- (7) para obter o próximo IMF (IMF_2), o IMF_1 é retirado do LFP e o processo se repete sobre este novo sinal ($LFP - IMF_1$).
- (8) isto é feito sucessivamente até a obtenção de um determinado número de IMFs estabelecido por nós ou utilizando como critério a obtenção de uma função monotônica (sem extremos). Com base em testes, utilizamos como critério de parada a obtenção de 13 IMFs.

Um problema conhecido do EMD é a mistura de IMFs, ou seja, sinais que deveriam ter sido separados acabam misturados em um único IMF (Wu and Huang, 2009). Para corrigir isto, Wu and Huang (2009) propuseram o método de *Ensemble Empirical Mode Decomposition* (EEMD), o qual efetivamente utilizamos nesta investigação através da sua implementação no pacote PSTA em Python 3 (https://pennmem.github.io/ptsa_new/html/index.html), o mesmo utilizado previamente (Lopes-dos-Santos; et al., 2018). O EEMD também utiliza o mesmo processo do EMD, mas com duas diferenças fundamentais: (1) ruído branco é adicionado ao sinal e (2) diversos EMD são computados paralelamente. Ao final, toma-se a média dos IMFs gerados por cada execução (note que neste caso o número de IMFs tem de ser predefinido). Como o ruído branco tem média zero, espera-se que ele seja praticamente eliminado com um número suficientemente grande de execuções (120 na nossa investigação).

Combinamos os IMFs com frequências médias instantâneas na faixa de 5 e 17 Hz para obtenção de teta. Notamos que um IMF possui frequência média em torno de 8 Hz; este IMF apresenta-se sinusoidal e com apenas um pico na sua densidade espectral de potência. Os sinais de baixa frequência e o sinal supra-teta foram configurados como a soma dos sinais IMFs com frequências médias inferiores a 5Hz e superiores a 17 Hz, respectivamente (adaptado de Lopes-dos-Santos et al, 2018). Definimos a frequência superior como 17 Hz, acima da banda tradicionalmente associada à teta (5 – 12 Hz), pois observamos também a presença de um IMF adicional com frequência média nesta faixa e que captura a assimetria dos ciclos teta. A densidade de potência espectral deste IMF revela um pico em teta (~8 Hz) e um outro pico na sua primeira harmônica (~16 Hz). Já a sua inspeção visual em comparação com o sinal bruto sugere que se trata de um sinal não-sinusoidal; ao somarmos os dois IMFs desta faixa, o sinal resultante aparenta capturar bem ciclos simétricos e assimétricos de teta.

6.7 Extração e quantificação de componentes espectrais teta (tSCs)

Como o nosso interesse é estudar a composição espectral de cada ciclo teta separadamente, partimos da literatura que identifica a ocorrência de gama baixo (low gamma; ~ 40 Hz) no vale do teta, e gama médio (mid-gamma – 80 Hz) no pico do teta (neste trabalho a referência será sempre o teta detectado na camada piramidal de CA1). Portanto, para identificar os ciclos teta individuais capturados durante períodos de atividade de comportamento exploratório (velocidade do animal > 2 cm/s) e de reconhecimento de objetos, definimos o início e fim do ciclo por duas ascendentes consecutivas (*zero-crossings* no sentido positivo). Neste caso, utilizar a região média da ascendente é uma estratégia para não cortar uma possível ocorrência de um gama naquele ciclo. Obtivemos, assim, todos os zero-crossing positivos e negativos, picos e vales. No caso dos picos e vales, utilizamos apenas extremos inter-espçados entre si por pelo menos 71 ms (14 Hz) e não mais do que 200 ms (5 Hz), e que apresentaram valores de amplitude maiores do que um desvio padrão da amplitude do teta e da amplitude do sinal lento infra-teta. Ademais, entre duas ascendentes de um ciclo candidato deveria conter apenas um pico, uma descendente e um vale detectados nesta ordem; a falha em detectar qualquer um destes pontos, ou uma ordem diversa desta, levava à rejeição do ciclo candidato. Posteriormente, confirmamos visualmente a detecção correta dos ciclos. Em seguida, obtivemos a média do espectrograma contínuo do sinal supra-teta dentro de cada ciclo teta detectado, produzindo assim uma densidade espectral para cada ciclo teta (Lopes-dos-Santos; et al, 2008). Note que neste processo perdemos a informação de tempo (em que fase do ciclo o

gama ocorreu) e preservamos apenas a informação da potência de um gama naquele determinado ciclo.

Os espectrogramas foram processados mediante com um conjunto de *wavelets* complexas do tipo Morlet com frequências principais de 10 a 200 Hz, e em passos de 1-Hz (utilizamos a função *scipy.signal.morlet* em Python 3). Para cada ciclo teta, obtivemos a média da amplitude do espectrograma ao longo das frequências (equivalente a uma densidade espectral para cada ciclo). Após, aplicamos Análise de Componentes Independentes (Independent Component Analysis - ICA) ao conjunto de assinaturas espectrais utilizando o algoritmo *FastICA* do pacote *scikit-learn* (<http://scikitlearn.org/stable/> em Python 3) (Lopes-dos-Santos; et al, 2018). Realizamos este procedimento para todos os canais separadamente de todos os animais e, seguindo Lopes-dos-Santos et al (2018), nomeamos cada componente espectral extraído como “componente espectral aninhado à teta” (*theta-nested Spectral Components* – tSCs). Note que o ICA extrai misturas independentes do sinal de forma não-supervisionada. Isto quer dizer que as múltiplas frequências de gama observadas neste trabalho foram definidas empiricamente, sem a aplicação de filtros passa-banda e/ou uso de faixas de frequência classicamente associadas à gama, como ocorre nos métodos tradicionais de estudo destas oscilações.

Uma possível interpretação do significado de cada componente espectral é como sendo ingredientes que, uma vez misturados em certas proporções, fabricam a densidade espectral original de cada ciclo teta. Desta forma esta decomposição não assume que cada ciclo terá necessariamente apenas um único componente espectral, mas sim que as frequências superiores que ocorrem dentro de cada ciclo podem ter na sua combinação uma oscilação rápida predominante, ou oscilações de frequências diferentes, mas com potência parecida, e até mesmo todas as oscilações rápidas conjuntamente.

Para calcular a contribuição de cada componente nos ciclos teta, projetamos os componentes sobre os tSCs (produto interno entre as componentes e um dado tSC). Este valor foi considerado como sendo a força da componente em um determinado ciclo (neste caso cada ciclo teta terá um único valor para cada componente, indicando a força ou contribuição daquela componente para a assinatura espectral do ciclo). Além disto, calculamos o produto interno de cada componente para cada ponto contínuo do espectrograma, criando assim um sinal de força instantânea daquela componente ao longo do tempo. Por fim normalizamos este sinal por *z-score*.

Para a análise de força da componente pela fase do teta, utilizamos interpolação linear entre os 5 pontos que definem o ciclo teta (ascendente, pico, descendente, vale, ascendente) para obter a fase do teta. Em uma análise paralela (dados não mostrados) também obtivemos a

fase pela transformada de Hilbert do sinal de teta e posteriormente o ângulo do sinal analítico resultante; os resultados, todavia, não diferiram.

Na análise da Figura 20, em que comparamos a força das tSCs no treino e teste, usamos a média das componentes registradas durante o treino e recalculamos a força das tSCs projetando estas mesmas componentes no espectro dos ciclos do treino e teste.

6.8 Análise estatística

Nesta investigação optamos por usar testes não-paramétricos devido ao N amostral ser relativamente baixo ($n = 9$ animais). Para os dados pareados, tais como comparação entre exploração de objeto e a arena, utilizamos o teste de Wilcoxon (*Wilcoxon signed-rank test*). Para dados de medidas repetidas, utilizamos o teste não – paramétrico de Friedman.

Uma preocupação adicional é o baixo número de eventos de exploração de objetos em comparação com a atividade exploratória geral na arena. Esta diferença na quantidade de ciclos e o baixo N amostral podem gerar resultados extremos por acaso. Para controlar isto, também geramos distribuições de controle. Para tanto, subamostramos com reposição os ciclos da atividade exploratória da arena usando o mesmo número de ciclos durante a exploração de objetos. Realizamos 10000 iterações para gerar uma distribuição de força média das tSCs (*bootstrap*). Após, normalizamos a força média das tSCs durante a exploração de objetos usando *z-score* em relação à distribuição controle. O resultado desta análise está na Figura 18. Neste caso note que valores positivos significam que a média da força da tSCs obtidas durante a exploração de objetos é maior do que a média da distribuição de ciclos subamostrados (diferença positiva). Para testar, usamos o intervalo de 95% de confiança da distribuição gerada por *bootstrap* (2.5° e 97.5° percentis).

7. RESULTADOS

O nosso interesse principal neste estudo foi verificar se existe uma assinatura eletrofisiológica específica durante a exploração de objetos, tanto na circunstância de novidade (codificação) quanto na evocação (Figura 17a). Mais especificamente, foi estudado se há diferenças entre o acoplamento fase-amplitude entre teta e múltiplas frequências mais rápidas nas duas situações. Assim separamos os momentos de exploração de objetos dos momentos de locomoção na arena. Para tanto usamos informação de vídeo e o rastreamento de um LED posicionado no topo da cabeça dos animais (Figura 17b). Definimos como período de exploração de objeto quando o animal estava a menos de 5 cm do objeto e com o corpo voltado ao mesmo. Também usamos a informação de que nestes períodos existe uma queda brusca na velocidade do animal (Figura 17c).

Para comparar os períodos de locomoção e exploração de objetos, iniciamos nossa investigação computando a potência das oscilações teta. Encontramos que a potência média do teta é igual nas duas situações (Figura 17e). Resultados anteriores demonstraram que existe uma relação linear positiva entre a potência de teta e a força do acoplamento teta-gama no hipocampo; o fato da potência do teta não decair durante a exploração é um indicativo forte de que não será uma fonte de viés nas análises posteriores.

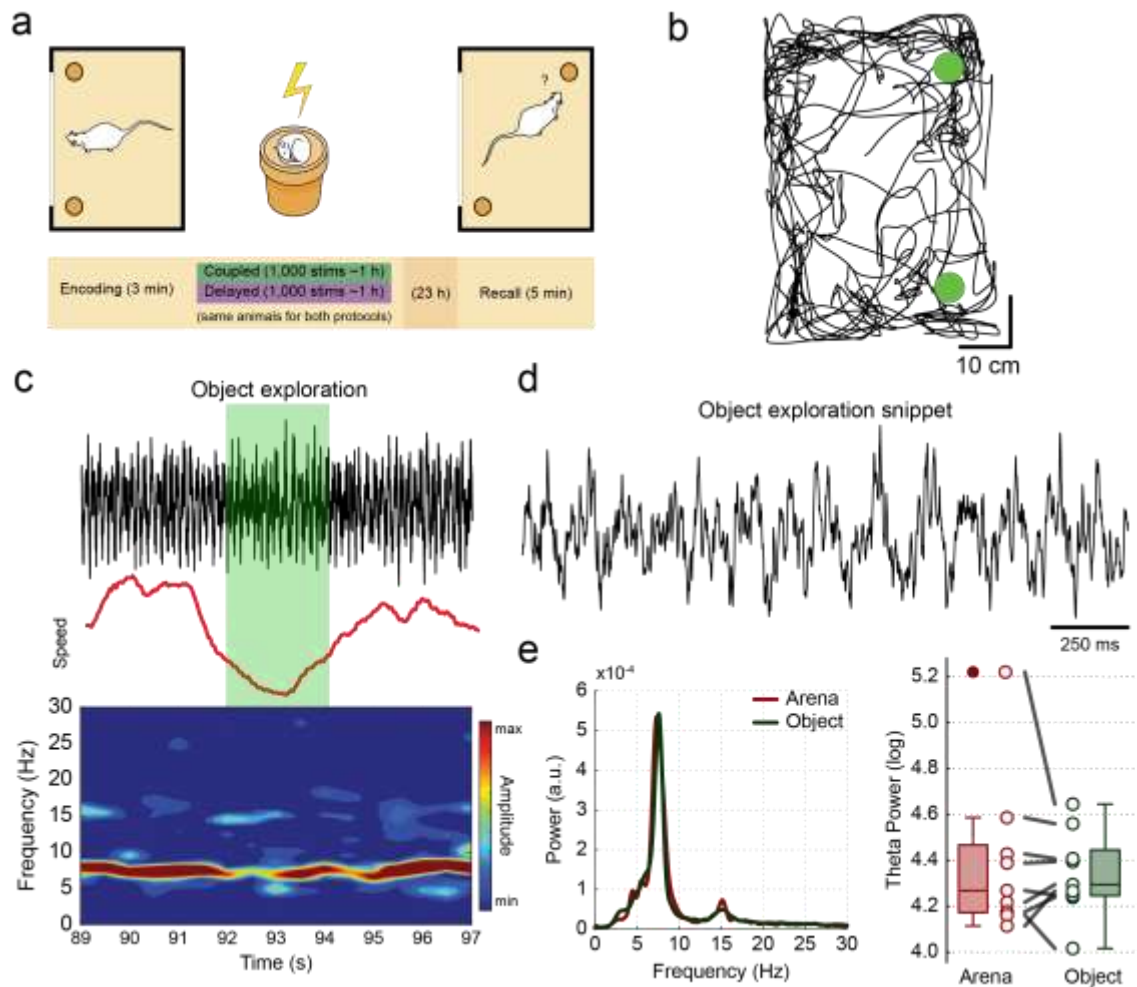


Figura. 17 Oscilações teta ocorrem durante a exploração de objetos. **(a)** Paradigma de exploração de objetos. Os animais são colocados em uma arena familiar com dois objetos novos e exploram por 3 minutos. Após 24 horas, os animais são retestados nesta arena por 5 minutos com um dos objetos deslocados. Figura retirada de Maingret et al. (2016). **(b)** Coordenadas x-y da exploração do animal. As posições dos objetos estão representadas em verde. **(c)** Espectrograma demonstrando a presença de oscilações teta durante um evento de exploração de objeto, mesmo com uma queda significativa na velocidade instantânea (em vermelho). Sombra verde representa a duração do encontro com o objeto. **(d)** Traço de LFP durante o evento de exploração do objeto. Note a presença de ciclos teta com oscilações mais rápidas sobrepostas. **(e)** Esquerda: Densidade espectral de potência de sinais durante a exploração de objetos (verde) e durante a exploração da arena (vermelho). Direita: distribuição das potências médias na faixa de teta para todos os animais (cada ponto corresponde à média de todos os eletrodos de um mesmo animal).

O nosso próximo passo foi estudar o acoplamento entre a fase de teta e a amplitude de gama. A primeira utilizada foi a abordagem mais convencional, o mapa de comodulação (ou comodulograma). Este mapa (Figura 18a) varre as frequências lentas e rápidas em busca de um acoplamento fase-amplitude entre quaisquer pares de frequências. Podemos verificar, nesta análise, a presença de um alto acoplamento entre teta e gama médio (*mid-gamma*, ~70 Hz) durante a exploração de objetos (Figura 18a, painel direito), mas não durante a locomoção livre na arena (Figura 18a, painel esquerdo). Prosseguimos construindo um mapa da amplitude de múltiplas frequências rápidas em função da fase do teta. Esta análise é complementar à do mapa de comodulação; nela isolamos apenas o teta como a oscilação geradora de fases e estudamos a amplitude das frequências rápidas em função dela. Assim preservamos a informação da fase preferencial em que ocorrem os picos das amplitudes das oscilações rápidas. Encontramos que o acoplamento entre teta – gama médio é explicado por um pico de amplitude do gama médio durante o início da fase descendente do teta (Figura 18b). E, novamente, encontramos uma amplitude maior de gama médio durante a exploração dos objetos em comparação com a locomoção livre. Como estes são casos particulares, realizamos análise de grupo. Na Figura 18c mostramos a média da amplitude do gama (60 – 90 Hz) para as fases do teta de todos os animais (média de todos os eletrodos piramidais). Note que a amplitude do gama em função da fase do teta é maior durante a exploração de objetos. Na Figura 18d simplificamos a visualização mostrando apenas o pico de amplitude de cada animal nas duas condições. E novamente percebemos que o pico de amplitude do gama médio é maior durante a exploração de objetos.

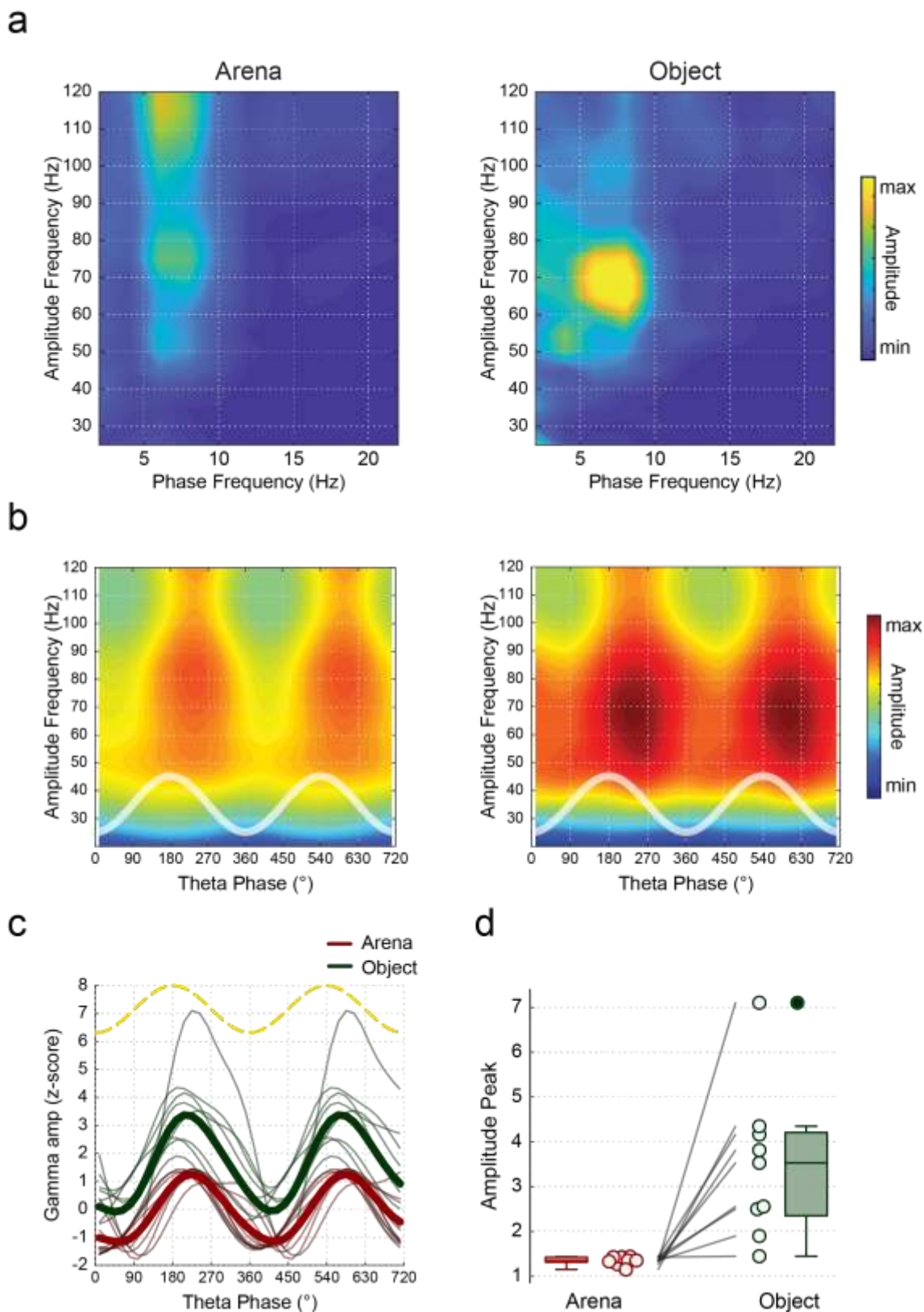


Figura 18. Acoplamento teta – gama aumenta durante a exploração. **(a)** Comodulogramas obtidos durante a exploração da arena (esquerda) e exploração de objetos (direita). Os comodulogramas possuem a mesma escala. **(b)** Distribuição da amplitude média para múltiplas frequências rápidas em função da fase do teta. Em branco estão dois ciclos teta superpostos

para referência. Note que a amplitude do gama médio é maior durante o pico e início da fase descendente do teta piramidal. (c) Distribuição da amplitude média de gama médio (60 – 90 Hz) em função da fase do teta. A amplitude foi normalizada por z-score. Em amarelo estão dois ciclos teta de referência. Traços claros e finos são diferentes animais; traço espesso é a média dos animais. (d) Distribuição dos picos de amplitude em (c). Teste não paramétrico de Wilcoxon (p-valor = 0.82). * denota que a diferença entre as distribuições é estatisticamente significativa.

A abordagem empregada até o momento possui alguns problemas. Notamos que alguns eletrodos demonstram a presença de ilhas de comodulação em outras frequências de gama, e outros com frequências misturadas ou com ilhas presentes, mas com valores mais tênues. Da forma como ele é construído, o comodulograma possui naturalmente baixa sensibilidade temporal e de frequências. Por exemplo, os eletrodos posicionados mais próximos da origem de um determinado gama, como o gama lento no *stratum radiatum* de CA1 (Schomburg et al., 2014) pode favorecê-lo e obscurecer possíveis outras oscilações rápidas presentes, como o gama médio vindo do *lacunosum – moleculare* de CA1 (Schomburg et al., 2014). A presença de múltiplos gamas e até mesmo oscilações beta podem ocorrer também na camada piramidal de CA1 (França et al., 2014, 2016; Scheffer-Teixeira & Tort, 2017; Lopes-dos-Santos et al., 2018); o comodulograma, todavia, como utiliza dados concatenados acabará favorecendo a oscilação que ocorre mais frequentemente e/ou com maior acoplamento, deixando as demais invisíveis. Outra limitação deste método é a sua baixa sensibilidade temporal (Tort, et al., 2010). Para construir os mapas de comodulação são necessários muitos dados de ciclos teta concatenados, algo que fica limitado pelo baixo tempo de exploração de objetos naturalmente encontrado neste paradigma (mas veja Araujo et al., 2020 para uma forma alternativa de aumentar este tempo de exploração). Por fim, os comodulogramas podem perder acoplamentos apenas pela forma como os filtros são empregados. Para que um filtro capture as variações na amplitude de uma oscilação rápida é necessário que ele capture também as bandas laterais (centro da frequência rápida \pm centro da frequência lenta). Por exemplo, considere uma oscilação de 80 Hz cuja amplitude é modulada por uma outra oscilação de 10 Hz. Para um filtro capturar as suas variações de amplitude, ele deve ser um passa-banda entre 70 e 90 Hz (ou seja, $80 \text{ Hz} \pm 10 \text{ Hz}$). Assim, o uso de bandas mais curtas nos filtros passa-banda ou na filtragem por *Wavelet* pode levar à perda de acoplamentos (Aru et al., 2014; Hyafil, et al., 2015) ou à mistura de oscilações de frequências diferentes, mas próximas.

Decidimos, portanto, aplicar o método desenvolvido recentemente por Lopes-dos-Santos et al. (2018) para aumentar a sensibilidade temporal e de frequência da nossa análise

(Figura 19). Neste método separamos a oscilação teta das oscilações mais rápidas (supra-teta) pelo método de EEMD. Na sequência, detectamos os ciclos teta individualmente e obtemos o espectro de potências médio do sinal supra-teta (10 – 200 Hz, passos de 1 Hz) mediante a transformada de Wavelet de cada ciclo. Note que neste caso cada ciclo teta fornecerá um PSD do seu ciclo, o que resume a composição espectral das oscilações rápidas presentes naquele determinado ciclo. Tendo em mãos este conjunto de PSD's de cada ciclo, obtemos assim as componentes espectrais através do método de ICA (Figura 19a). O conjunto destas componentes espectrais reconstroem quaisquer PSDs observados ciclo-a-ciclo apenas por uma combinação linear. Além disto, note que esta análise atribui a cada ciclo um peso único para cada uma das componentes, refletindo o quanto aquela determinada componente contribui para a composição espectral rápida do ciclo. Este peso é obtido pela projeção da componente espectral no PSD observado em cada ciclo (produto interno entre a componente e o PSD). Interpretamos o valor resultante como sendo a força da componente naquele ciclo.

Encontramos 4 componentes espectrais de interesse no intervalo de 20 a 100 Hz. Nomeamos as componentes como tSC1 – 4 de forma idêntica ao realizado por Lopes-dos-Santos et al. (2018) a fim de facilitar comparações (Figura 19a painel superior; *theta-nested Spectral Component*). O pico de amplitude destas componentes está representado sobreposto às componentes; no painel inferior da Figura 16a mostramos a variação destas componentes por animais. Note que além de consistente, a frequência – pico das componentes não se sobrepõem. Seleccionamos então os ciclos que expressavam as maiores forças (acima do 80º percentil) e calculamos o espectro de amplitude médio destes ciclos em função da fase de teta (Figura 19b). Note a presença de 4 ilhas de comodulação entre teta e as múltiplas componentes, cada qual com picos de amplitude nas suas respectivas faixas de frequência. Realizamos inspeção visual dos ciclos expressando as componentes e verificamos a presença das oscilações no sinal bruto do LFP. Tal preocupação se deve à possibilidade destas oscilações serem artefatos de análise, tal como harmônicas dos ciclos teta.

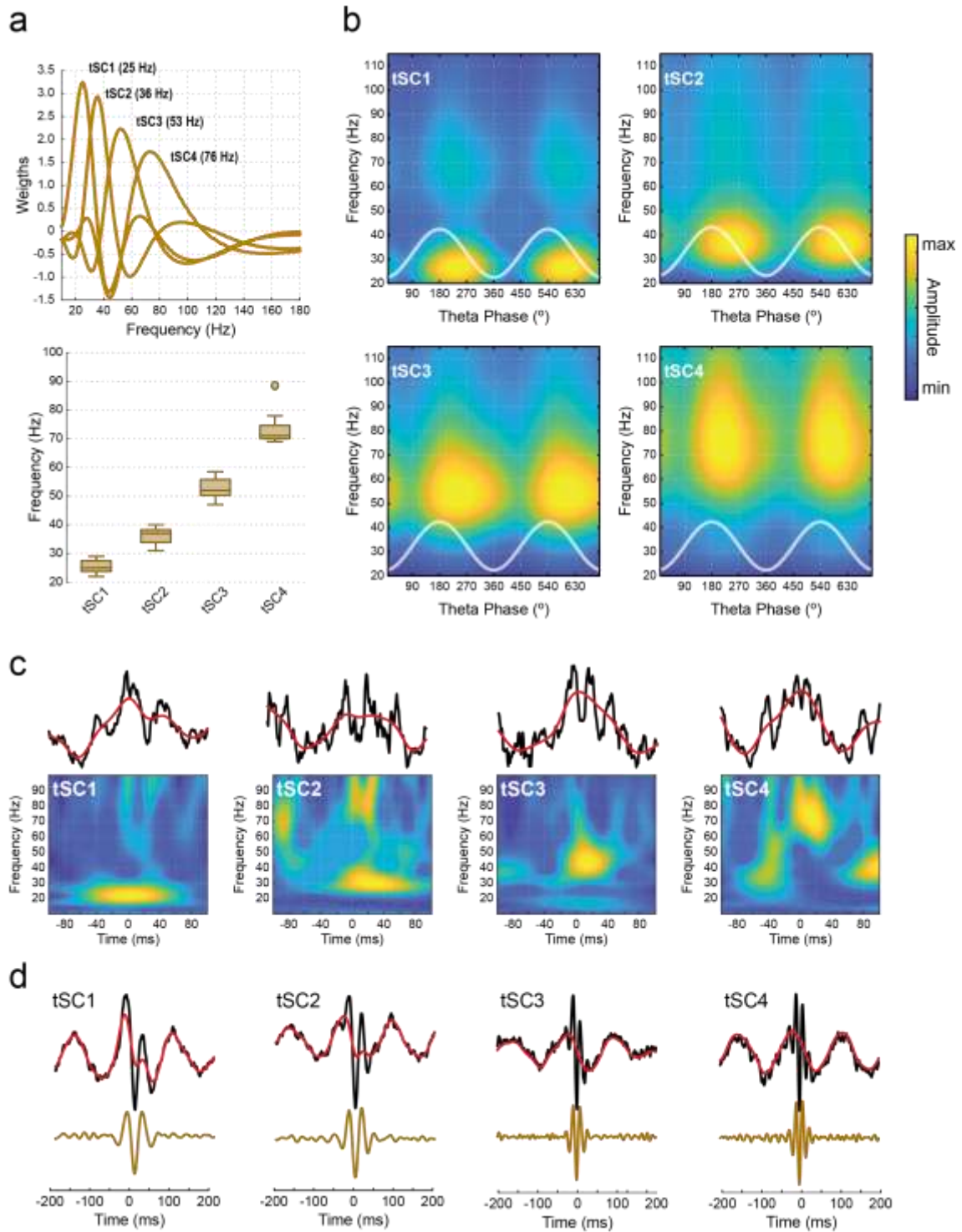


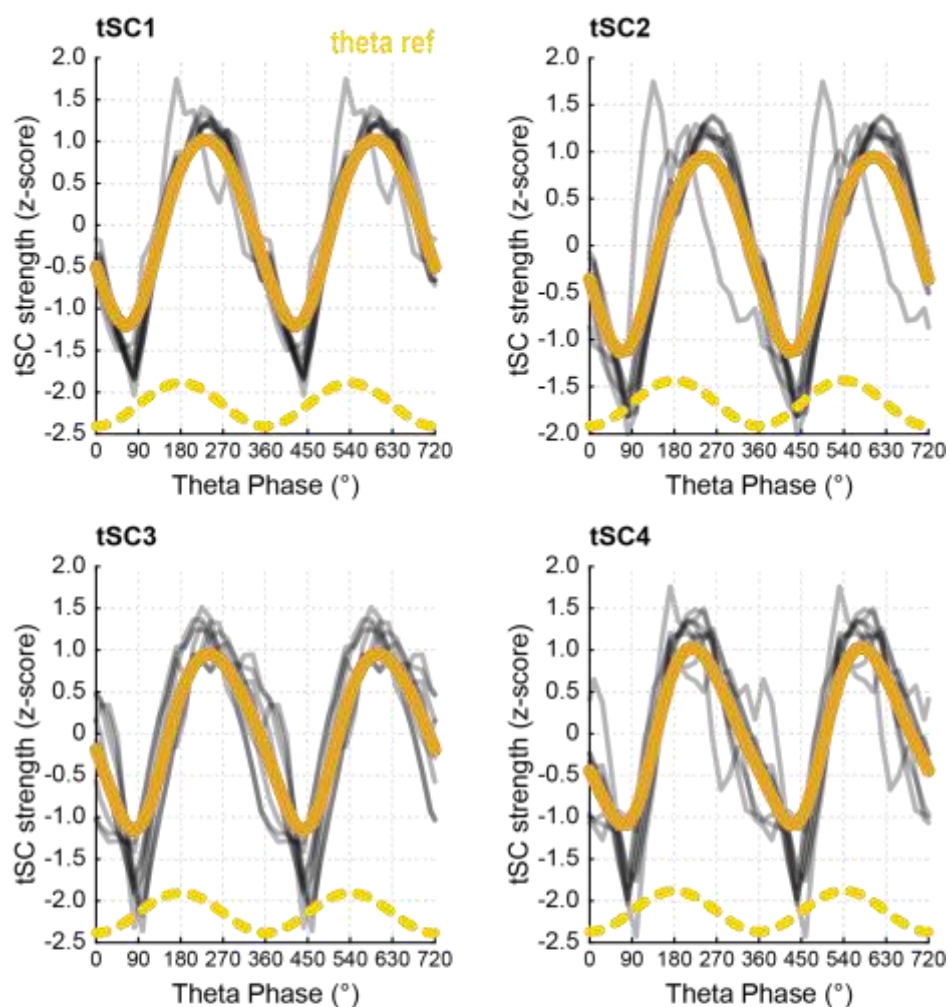
Figura 19. Ciclos teta acoplam-se a múltiplas oscilações de frequência rápida. **(a)** Componentes espectrais associados a teta. Os componentes foram extraídos das assinaturas espectrais de cada ciclo teta individualmente por ICA usando dados de toda a sessão de exploração. Dados compõem a média de todos os animais e eletrodos. Nomeamos em ordem crescente de pico de frequência os componentes como tSC1 – 4. **(b)** Distribuição da amplitude dos tSCs em função da fase de teta. Apenas ciclos cuja força do tSC ficou acima do percentil 80 foram usados. Em todos os casos os tSCs apresentam-se acoplados à fase de teta. Mas note que durante a seleção

dos componentes em nenhum momento foi utilizada a informação de fase de teta. Em branco dois ciclos teta são mostrados para referência. **(c)** Exemplos de ciclos teta individuais com alto valor de força para cada tSC. **(d)** Média do LFP (preto), teta (vermelho) e sinal de tSC (laranja) disparados pelo valor mínimo do sinal de tSC dos ciclos com maior força. O sinal de tSC foi definido como o IMF cuja frequência média era a mais próxima do pico de frequência da componente. Esta figura foi baseada na Figura 1 de Lopes-dos-Santos et al. (2018).

Por fim, usando estes ciclos expressando as maiores forças para cada tSC, buscamos o valor mínimo do IMF cuja frequência era a mais próxima de cada tSC e calculamos a média em torno do sinal de LFP e do teta usando uma janela de 400 ms. Esta análise complementar visa mostrar a presença daquele IMF no LFP e de forma consistente na mesma fase do teta; caso contrário, a média do LFP iria eliminar a oscilação rápida. Esta figura também configura como uma reprodução dos resultados obtidos por Lopes-dos-Santos et al. (2018).

Investigamos também a distribuição da força das tSCs pela fase do teta (Figura 20). Para tanto calculamos a força das componentes de forma contínua usando o produto interno entre a componente e cada ponto do espectro de potências contínuo (obtido pela transformada de Wavelet). Após, construímos a distribuição de força da tSC pela fase do teta usando os ciclos que expressaram as maiores forças em média (Figura 20a; mesmo procedimento usado na Figura 20b). Note que estes resultados não apenas confirmam visualmente o resultado da Figura 20b, mas permitem obter apenas um ponto máximo de fase preferencial do teta. Verificamos que a fase do teta em que ocorre a força máxima dos tSCs é a mesma para todas as componentes ($\sim 225^\circ$, correspondente ao início da fase descendente da oscilação teta).

a



b

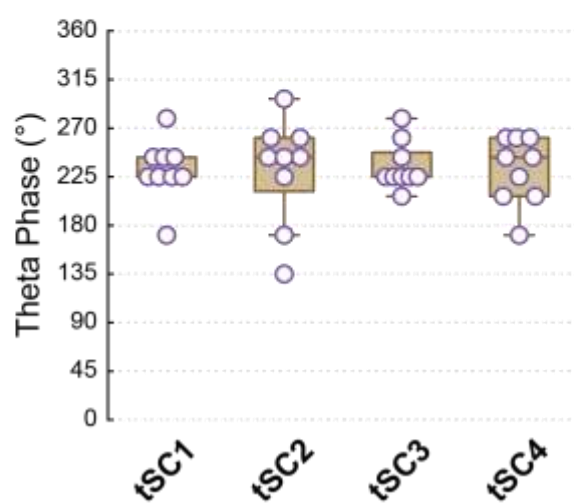


Figura 20. Fases preferenciais da força máxima das tSCs é a mesma. (a) Distribuição da força contínua (normalizada) das tSCs pela fase do teta. Traço laranja espesso corresponde à média dos animais. Traços pretos transparentes correspondem à distribuição individual de cada

animal. Em amarelo estão dois ciclos teta de referência. **(b)** Distribuição das fases máximas de cada tSC para cada animal. Note que todas as tSCs aglomeram-se em torno de 225° , correspondente ao início da fase descendente do ciclo teta.

Dado que conseguimos corretamente reproduzir a obtenção das 4 tSCs e que o seu valor de força em cada ciclo reflete a presença daquela oscilação, prosseguimos então para o estudo da força das tSCs durante os eventos de locomoção e exploração de objetos. Nossa primeira abordagem foi comparar a força das tSCs dos ciclos ocorridos durante a exploração de objetos com os ciclos durante locomoção livre (Figura 21a). Nossos resultados demonstram que apenas a força da tSC4 foi consistentemente maior na exploração de objetos do que na locomoção (Figura 21a). Todavia, esta diferença poderia ser explicada por uma relação linear entre a velocidade do animal e a força das tSCs: caso uma tSC apresente força maior para velocidades mais lentas, ela seria favorecida nesta análise já que a comparação da exploração de objetos, onde a velocidade é por definição lenta, seria feita contra a média da força para velocidades lentas e rápidas.

Na Figura 21b mostramos a relação entre a velocidade do animal e a força das tSCs para momentos de locomoção livre (pontos vermelhos denotam a média da força dos animais, barras denotam intervalo de 95% de confiança). Em cada gráfico mostramos à esquerda os dados obtidos durante a exploração de objetos (mesmos dados da Figura 21a) para comparação junto com o intervalo de 95% de confiança. Note a presença de correlações lineares entre a força das tSCs e a velocidade: tSC1 e tSC2 possuem correlação negativa, ao passo que tSC3 e tSC4 possuem correlação positiva (mas note que a correlação linear da tSC3 é fraca; veja a Figura 21c para os coeficientes de correlação linear de Pearson usando todos os animais e a Figura 21d para os coeficientes separados por cada animal). Comparando os intervalos de confiança das taxas de velocidade e da exploração de objetos notamos que para os tSCs 1-3 existe uma alta sobreposição ao longo da linha de regressão, mas principalmente para as velocidades mais lentas; para o tSC4, todavia, a sobreposição ocorre a partir da velocidade de 15 cm/s. Em uma análise complementar, calculamos a distância dos ICs durante a exploração de objetos para a reta de regressão na velocidade representativa de 3 cm/s. A intenção desta análise é realizar uma normalização do intervalo de confiança dada a distribuição das forças em relação à velocidade do animal. Nosso próximo passo, então, foi comparar os valores de força para ciclos mais lentos (<10 cm/s). Encontramos que, novamente, apenas o tSC4 possui força média maior durante a exploração de objetos, ao passo que os demais tSCs não são significativamente diferentes (Figura 21e).

Notamos visualmente ao longo desta figura uma certa tendência para as tSCs 1 e 2 durante a exploração de objetos possuírem valores medianos de força abaixo do controle de ciclos em velocidades lentas, bem como possuindo um intervalo de confiança abaixo da reta de regressão também para uma velocidade lenta. Apesar disto, destacamos que o tamanho amostral é baixo e existe uma alta sobreposição de ICs para velocidades lentas. Portanto, manteremos uma postura cética quanto a possíveis efeitos inibitórios da exploração de objetos na força das tSCs 1 e 2. Caso isto seja um fenômeno real, aparentemente o tamanho de efeito seria baixo o suficiente para que a nossa amostra não tenha poder para capturar esta variação.

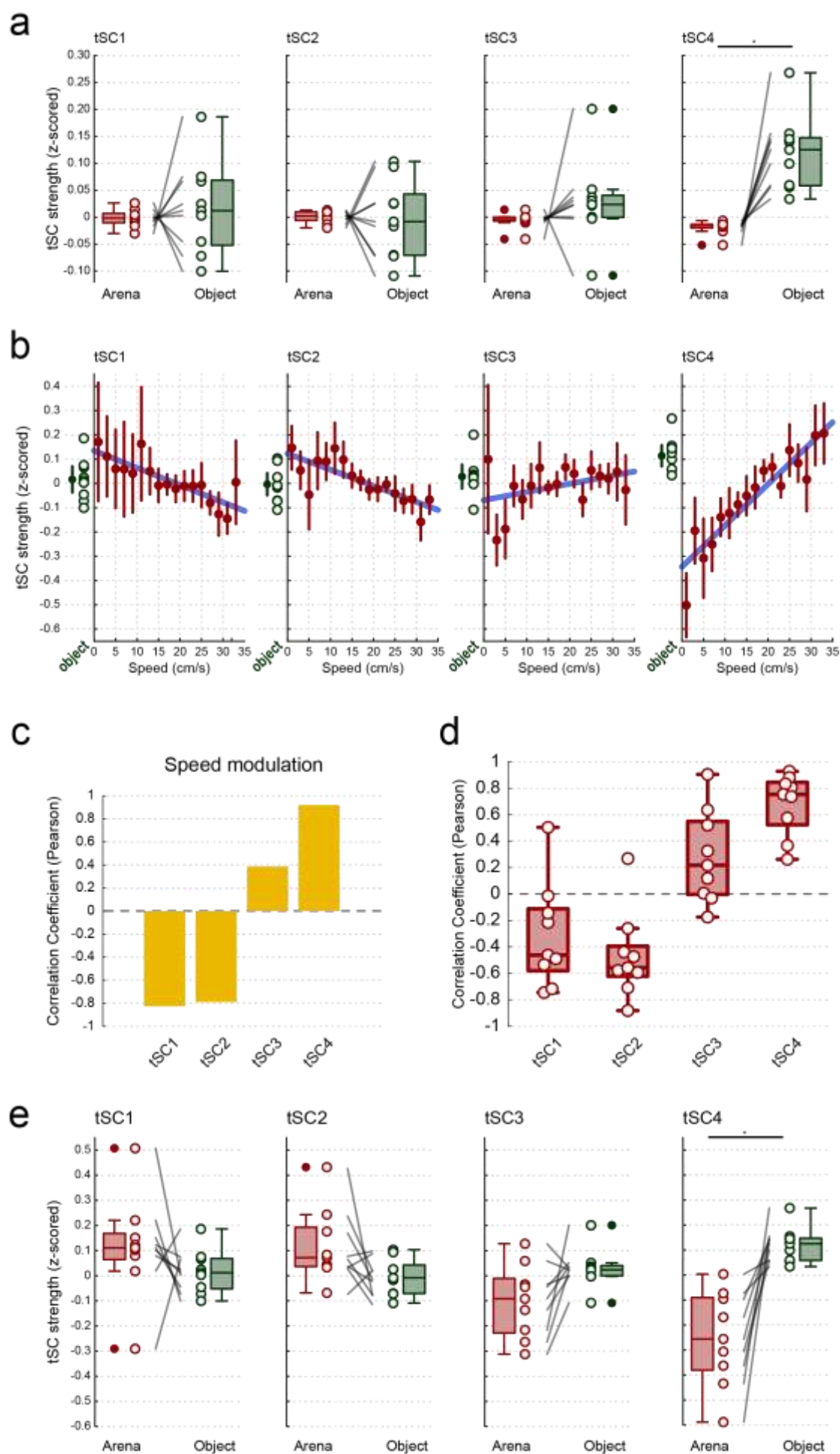


Figura 21. A força da tSC4 é maior durante a exploração de objetos. **(a)** Distribuição das forças médias de cada tSC durante a exploração ativa da arena (vermelho) e dos objetos (verde). Teste não paramétrico de Wilcoxon (tSC1 p-valor = 0.65; tSC2 p-valor = 0.1; tSC3 p-valor = 0.2; tSC4 p-valor = 0.0039). **(b)** Distribuição da força dos tSC pela velocidade média do ciclo teta durante exploração ativa da arena. Círculos vermelhos denotam média, e as barras verticais são o intervalo de 95% de confiança. À esquerda de cada gráfico, em verde, estão os valores da exploração de objetos como referência (mesma distribuição do painel **a**). Note que se tomarmos os valores da força dos tSCs para as velocidades menores (<10 cm/s), há sobreposição dos IC para os tSCs 1-3; já para o tSC4 ocorre sobreposição a partir de 17 cm/s. Intervalo de 95% de confiança para o parâmetro β_1 (inclinação): tSC1_{locomção} = [-0.01; -0.004]; tSC2_{locomção} = [-0.01; -0.004]; tSC3_{locomção} = [-0.001; 0.008]; tSC4_{locomção} = [0.013; 0.021]. **(c)** Coeficiente de correlação de *Pearson* computado usando a média da força de cada tSC para as faixas de velocidade do painel **b**. Este valor corresponde ao coeficiente de correlação para o painel **b**. Todos os animais foram usados nesta análise. **(d)** Distribuição dos coeficientes de correlação entre a força dos tSCs e a velocidade para cada animal separadamente. **(e)** Distribuição das forças dos tSCs para ciclos teta lentos (<10 cm/s) em comparação com os ciclos de exploração dos objetos (mesma distribuição do painel **a**, observe as escalas diferentes). Teste não-paramétrico de Wilcoxon (tSC1 p-valor = 0.3; tSC2 p-valor = 0.074; tSC3 p-valor = 0.054; tSC4 p-valor = 0.0039). Notamos que durante a exploração de objetos a velocidade do animal pode cair próximo de zero, mas contabilizamos também um pequeno período de chegada e saída do objeto, ou pequenas movimentações em torno dele; portanto, não comparamos as distribuições considerando apenas a velocidade menor de exploração da arena (1 cm/s), mas sim uma faixa de velocidades compatíveis com a exploração dos objetos. * denota que a diferença entre as distribuições é estatisticamente significativa.

Realizamos, então, mais uma análise controle. Como os períodos de exploração de objetos são menores do que a locomoção livre ao longo da arena, o resultado obtido para a tSC4 poderia ser explicado por variações aleatórias positivas, dado o N amostral baixo. Tal efeito pode ocorrer principalmente em conjunto de dados em que múltiplos testes são realizados (*p-hacking*). De fato, notamos com preocupação que a variação das forças das tSCs durante a exploração de objetos é maior do que a força durante a locomoção (note que os *boxplots* da Figura 21a possuem intervalo interquartil maior para a exploração de objetos). Para corrigir este problema, realizamos subamostragem aleatória dos ciclos durante a locomoção lenta (velocidade < 10cm/s) usando o mesmo número de ciclos observados na exploração de objetos. Criamos, assim, uma distribuição controle (Figura 22a) e calculamos a distância do valor obtido

durante a exploração de objetos à esta distribuição por z-score. Na Figura 22b mostramos a distribuição destas distâncias. Confirmamos assim que apenas a mediana da distância da força do tSC4 é diferente de zero, ao passo que a distribuição das demais tSCs não possui diferença estatisticamente significativa. De fato, todos os valores da tSC4 demonstraram tendência positiva em relação à média zero da distribuição-controle, ao passo que os demais tSCs variaram em torno de zero.

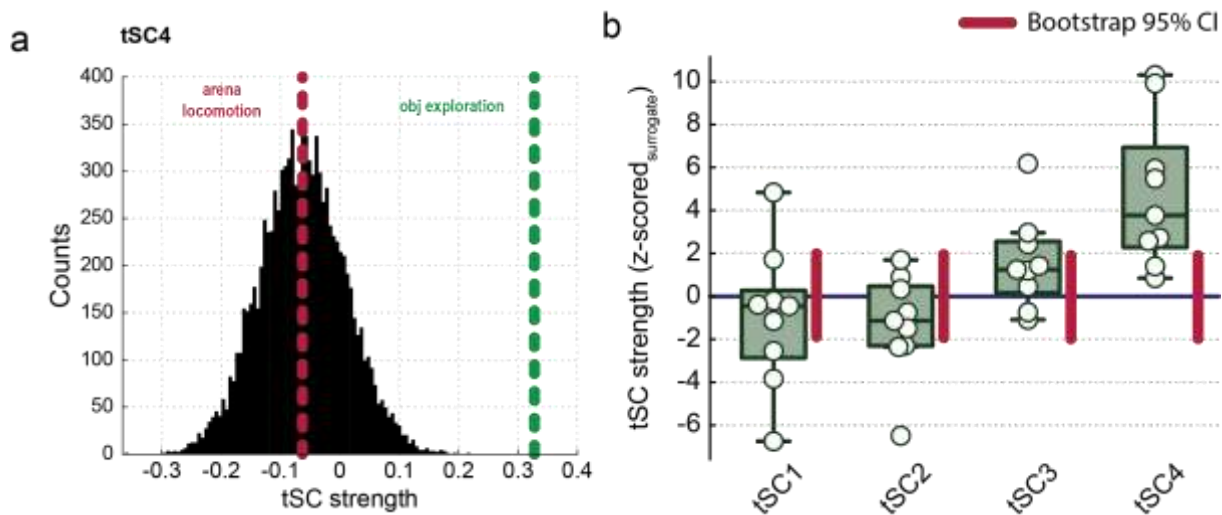
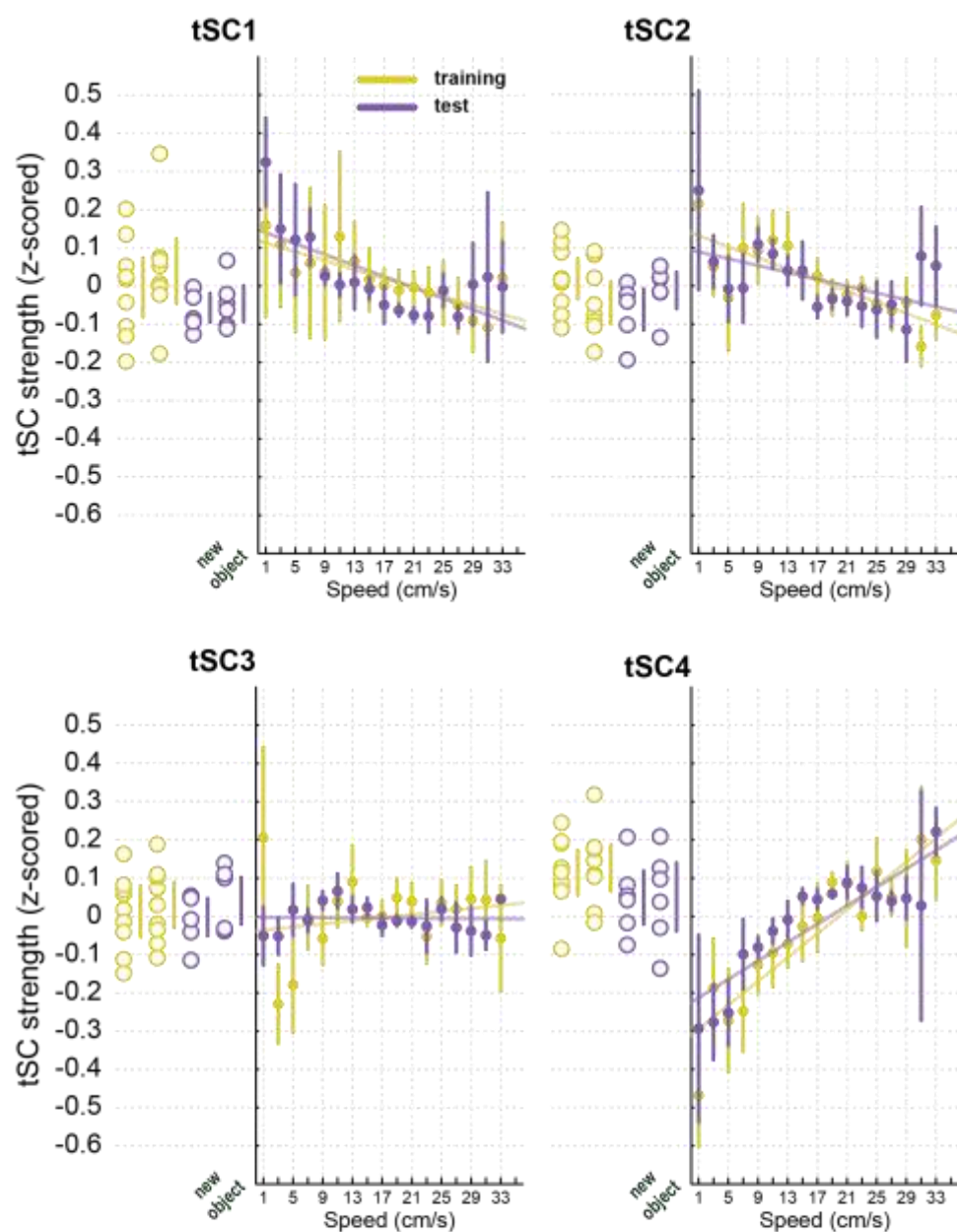


Figura 22. Controle por *bootstrap*. (a) Distribuição da força dos tSCs por subamostragem com reposição (*bootstrap*) dos ciclos teta durante locomoção na arena (apenas ciclos com velocidade menor do que 10 cm/s foram usados). A média da distribuição está representada pela linha vermelha tracejada vertical; e a média da força do tSC durante a exploração de objetos, pela linha verde tracejada vertical. Neste exemplo apenas o tSC4 do eletrodo de um animal foi usado. (b) Distribuição das forças dos tSCs em relação às suas respectivas distribuições-controle. Cada ponto é a média da força dos tSCs dos eletrodos de um único animal. Os dados gerados por *bootstrap* foram normalizados por z-score e a média da exploração de objetos foi referenciada a esta distribuição normalizada. Barras verticais vermelhas denotam a média do intervalo de 95% de confiança da distribuição gerada por *bootstrap* para cada animal (note que como os dados foram transformados por z-score, o intervalo é aproximadamente ± 1.96 para todas as distribuições). Apenas a mediana da força do tSC4 não ficou dentro do IC 95%.

Por fim, comparamos os valores da força das tSCs entre treino e teste. A nossa hipótese de trabalho é a de que se a tSC4 está envolvida com a codificação, esperamos ver uma diminuição da sua força durante o teste; mais ainda, esperamos ver uma diminuição durante a exploração do objeto “antigo” em comparação com o objeto “novo” (deslocado). Já para as

tSCs 2 e 3 esperamos ver o contrário: um aumento da sua força na exploração geral e, especialmente, do objeto antigo em comparação com o objeto novo (tais hipóteses estão amparadas em trabalhos como Zheng et al (2016) e Lopes-dos-Santos et al (2018)). Encontramos, todavia, ausência de diferenças para todas as tSCs (Figura 23a). Note que tanto as distribuições das forças por velocidade quanto os intervalos de 95% de confiança possuem alta sobreposição. Além disto, as forças observadas na exploração dos objetos não foram diferentes entre os objetos novos da sessão de treino e os objetos antigo e deslocado da sessão de teste. Note, porém, que o índice de discriminação dos objetos não foi significativo, apesar de apresentar uma tendência visual (Figura 23b). Vale lembrar que os dados de teste possuem um N ainda mais reduzido, 6 animais, o que ocorreu por problemas no *dataset* (estes três animais não tinham os dados de teste disponíveis).

a



b

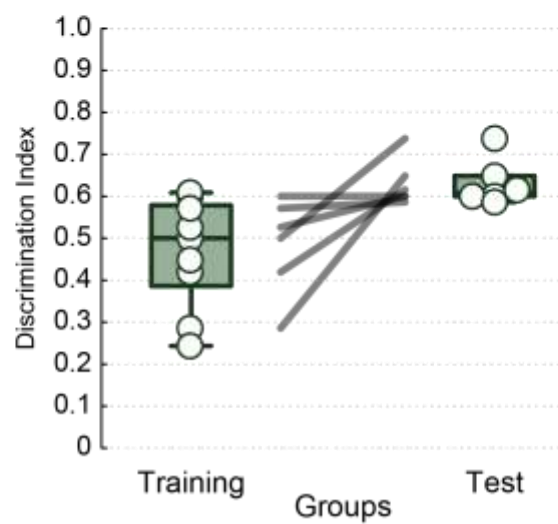


Figura 23. Ausência de evidências para diferenças na força dos tSCs durante evocação. **(a)** Correlação entre velocidade e força dos tSCs durante treino e teste. À esquerda de cada painel estão os valores da força média dos tSCs durante a exploração dos objetos de forma individualizada. Coeficiente de correlação de *Pearson*: tSC1_{treino} = -0.82; tSC1_{teste} = -0.69; tSC2_{treino} = -0.81; tSC2_{teste} = -0.52; tSC3_{treino} = 0.22; tSC3_{teste} = -0.03; tSC4_{treino} = 0.91; tSC4_{teste} = 0.87. Intervalo de 95% de confiança para o parâmetro β_1 (inclinação): tSC1_{treino} = [-0.008; -0.004]; tSC1_{teste} = [-0.011; -0.003]; tSC2_{treino} = [-0.010; -0.004]; tSC2_{teste} = [-0.008; -0.001]; tSC3_{treino} = [-0.003; 0.007]; tSC3_{teste} = [-0.002; 0.002]; tSC4_{treino} = [0.012; 0.020]; tSC4_{teste} = [0.008; 0.016]. Teste de Friedman para a força das tSCs durante a exploração de objetos (pontos à esquerda dos painéis). tSC1 $\chi^2 = 4.4$, p-valor = 0.22; tSC2 $\chi^2 = 5.4$; p-valor = 0.14; tSC3 $\chi^2 = 1.4$; p-valor = 0.71; tSC4 $\chi^2 = 2.6$; p-valor = 0.46. **(b)** Distribuição do índice de exploração dos objetos durante o teste. Teste de Wilcoxon: p-valor = 0.063.

8. DISCUSSÃO

As análises aqui realizadas foram estruturadas de modo que trouxessem características mais detalhadas sobre as oscilações neuronais situadas em CA1 hipocampal. Deste modo, conseguimos reproduzir o método de Lopes-dos-Santos (2018) para a extração dos sinais neurais brutos de LFP em diversas bandas de frequência, cuja aplicação nos permitiu identificar 4 componentes espectrais acopladas ao ritmo teta (tSCs) durante a tarefa comportamental planejada. Com isso, demonstramos a capacidade da técnica em elencar mais informações sobre os espectros de correlatos neurais para a codificação do espaço. Ainda assim, demonstramos que este método, sem filtrações previamente especificadas, viabiliza a investigação de informações como a fase predominante de cada componente espectral (frequências individuais acopladas à teta) identificado em diferentes etapas da tarefa de reconhecimento espacial de objetos.

Outro dado interessante diz respeito a compreensão da usual presença de teta, identificada nas análises do registro de LFP feito durante sono REM e locomoção ativa (Axmacher, 2016). Hipótese distinta da aqui encontrada, a qual exibiu a existência da frequência de teta durante a exploração de objetos, cuja velocidade do animal é lenta ou totalmente inerte, bem como, apontou uma correlação positiva entre tSC4 e a velocidade do animal, conforme visto na figura 21. Dados que denotam o aumento de diferentes perspectivas, no que se refere ao estudo de circuitos eletrofisiológicos em/entre regiões associadas ao tipo de memória especificada.

A caracterização das propriedades oscilatórias nos permite investigar e descrever os correlatos existentes entre as redes neuronais de áreas específicas, no caso em questão CA1 hipocampal, mas também entre áreas corticais e/ou associativas. Neste primeiro ponto é importante trazer a existência do que chamamos de hierarquia oscilatória, a qual, conforme Simon & Wallace (2016) a fase das oscilações de baixa frequência modula o poder das frequências mais altas através do acoplamento fase-amplitude, outra análise também realizada aqui. A fase das oscilações delta (inferior) influencia a amplitude das oscilações teta (meio). A fase das oscilações delta e teta influencia a amplitude das oscilações gama (superior) (Simon & Wallace, 2016).

O principal achado da nossa investigação foi depreender o aumento do gama médio da faixa de ~70 Hz (tSC4) durante a exploração dos objetos, o qual ocorreu tanto no treino, quanto no teste, ou seja, durante etapas de codificação e recuperação da memória. Dados de estudos recentes já têm associado os acoplamentos entre a banda de teta e as variações do ritmo gama aos processos de comunicação entre regiões essenciais. Contudo, de modo ainda não

completamente conhecido. Dito de outra forma, ainda não se sabe o modo como as frequências rítmicas se complementam integrando elementos temporais, espaciais e contextuais de determinado episódio (Axmacher, 2016).

Mediante a execução de protocolos experimentais, aceita-se que os ritmos gama sistematizem conjuntos neuronais mediante a sincronização da atividade das células que codificam informações relacionadas (Bragin et al., 1995, Harris et al., 2003, Fries, 2009, Colgin, et al., 2009). Sendo importante enfatizar que a divisão da frequência gama em subtipos rápidos e lentos que encaminham fluxos de informações de modo separado. Alguns estudos (Colgin et al., 2009; Brun et al., 2002; Fyhn et al., 2004 e Hafting et al., 2005) informam que gama rápida acopla o hipocampo com entradas do MEC (córtex entorrinal medial), as quais propagam informações relacionadas a atual localização espacial, necessário para uma nova codificação de memória (Brun et al., 2008).

Gama lento tem sido associada à conexão do subcampo CA1 hipocampal às entradas de CA3, a qual demonstra ter um relevante papel na recuperação da memória (Brun et al., 2002, Sutherland et al., 1983, Steffenach et al., 2002). Colgin et al. (2009) traz que os diferentes tipos de gama (rápida e lenta) aparecem e co-ocorrem em fases diferentes dos ritmos na frequência teta. Em concordância, estudos recentes trazem que variação entre subtipos gama rápidos e lentos demonstram também associação a estratégias comportamentais utilizadas em uma tarefa de memória espacial (Cabral et al., 2014). A ilustração abaixo representa de modo sistematizado oscilações registradas de acordo com o tempo e fase de processamento da informação até retornar ao córtex.

Em uma localização fixa, quando o contexto tem uma ligeira modificação quanto à sua localização espacial, o giro dentado e CA3 expressam uma separação de padrões que é consistente com a mudança no padrão de atividade associada à assembleia da célula ativa (Leutgeb et al. 2007). Stark & Stark (2017) acrescentam que, em humanos, o índice da discriminação de objetos apontou relação positiva com o volume do hipocampo, de modo mais específico, os subcampos de DG e CA3 vinculados e o subículo, direcionando novamente para o papel de separação de padrões das estruturas supracitadas no comportamento de discriminação de objetos (Stark & Stark, 2017). Configurações que mais uma vez refletem os possíveis correlatos eletrofisiológicos associados entre as áreas de processamento mnemônico relatadas.

Colgin e colaboradores (2009) evidenciam a probabilidade de o objeto novo influenciar mudanças neuromodulatórias como o acoplamento de frequências mais altas de gama em CA3 e CA1 hipocampal. Uma das possibilidades para tal neuromodulação é a acetilcolina, cujo nível é aumentado em reação a novos estímulos (Newman et al., 2013).

Dentro desta perspectiva, Mormann et al. (2005) investigou a ligação entre o acoplamento teta-gama do hipocampo de seres humanos e o desempenho da memória utilizando o paradigma de reconhecimento de palavras. Eles encontraram que a força do acoplamento entre a fase teta e a potência gama de 45 Hz foi maior durante a recordação de palavras previamente apresentadas. Este trabalho representou a hipótese de que recrutamento de oscilações gama em uma fase teta particular facilitou a recuperação de memórias de experiências anteriores. Ao estudar o disparo de células de lugar durante frequências de gama rápida e lenta moduladas por teta, Bieri et al. (2014) forneceram suporte indireto para a possibilidade de que gama rápida esteja envolvida na codificação da memória, destacando a hipótese de que células individuais já disparadas anteriormente em seus campos de lugar, agrupam células de lugar preferencialmente especificadas para informações que foram codificadas como parte do passado recente (Bieri, Bobbitt & Colgin, 2013).

Se gama lenta e rápida modulada por teta servirem funções de recuperação e codificação de memória desassociadas, assegurar que os mesmos aconteçam em distintas fases teta talvez possa evitar a interferência entre a recuperação de memória e a codificação, conforme hipotetizado por Hasselmo, Bodelon & Wyble (2002).

Colgin (2015) traz que em modelos animais foi registrado, em CA3 hipocampal, o acoplamento entre a fase teta e a amplitude da gama de 40 Hz, a qual melhorou conforme os animais aprendiam a tarefa. Essa interação foi registrada no decorrer da exploração, em um momento anterior no qual presumivelmente os animais recuperaram sua memória da resposta correta associada a um contexto específico. Trimper, Stefanescu, Manns (2014) relataram a existência e o aumento da coerência gama de 30–50 Hz entre CA3 e CA1 enquanto ratos exploravam novos objetos. Os aumentos observados na coerência gama lenta foram maiores para objetos que foram de modo sequencial mais bem recuperados, em detrimento dos objetos recuperados com menor acurácia.

Entre os nossos resultados, também encontramos a existência de uma correlação positiva entre a força do gama rápido com a velocidade do animal. Como visto nos estudos de Lopes-dos-Santos (2018) e Chen et al., (2011), os quais trazem como possível hipótese explicativa a ideia de que as células de codificação dos ratos têm maior probabilidade de adaptação ou variação de tamanho conforme as diferentes velocidades relacionadas. Em ratos, as alterações sistemáticas na faixa de gama do hipocampo associada a velocidade podem auxiliar na estabilização da posição e o tamanho espacial (Ahmed; Mehta, 2012).

Prováveis funções de frequência gama co-ocorrendo em velocidades aumentadas Montgomery e Buzsáki (2007) demonstraram que a potência gama total amplificou em locais característicos na pista onde o rato exibiu maior probabilidade de tomar decisões. Foi sugerido

pelos autores que a potência geral na banda gama pode codificar informações para além das frequências do ritmo gama.

Acredita-se que o animal pode fazer a transição entre cada elemento da sequência espacial de células locais mais agilmente, representada através do aumento das frequências gama em maiores velocidades (Ahmed; Mehta, 2012). Em cada ciclo gama é possível observar a ativação de um elemento na sequência de organização de células e, em velocidades superiores, transições mais rápidas são percebidas entre os elementos da estruturação das células (Senior et al., 2008; Maurer et al., 2012). Ahmed & Mehta (2012) mencionam ainda, que essas transições mais rápidas podem viabilizar às células de lugar, a retenção da sua caracterização espacial apesar das velocidades de corrida mais rápidas, possibilitando que o hipocampo codifique a informação espacial, mesmo em altas velocidades e na ausência de pistas externas. Estes dados sugerem que esta relação entre a velocidade e o aumento do acoplamento teta-gama pode fornecer suporte à preservação da especificidade espacial das células de lugar e das memórias espaciais como apontado nas pesquisas de Ahmed & Mehta (2012).

Em consonância com a interpretação obtida com a tratativa dos dados relacionados às frequências mais rápidas de gama em CA1 em ratos, Colgin, et al. (2009) destaca que as mesmas são mais coerentes com oscilações gama de alta frequência no córtex entorrinal, ao passo que oscilações gama lenta em CA1 de frequência mais são mais coerentes com baixa frequência oscilações gama em CA3 (Colgin et al., 2009).

A junção destes dados aponta para a hipótese estabelecida por Colgin (2015) de que CA1 pode ser estimulado preferivelmente pelo córtex entorrinal em velocidades de corrida mais rápidas e por CA3 em velocidades de corrida mais lentas, sendo necessário estudos mais específicos que abarquem registros de LFP e realização das análises espectrais das áreas implicadas, de modo simultâneo.

Assim, de forma a aumentar a transparência desta investigação, destacamos algumas das suas limitações e como iremos abordá-las posteriormente.

- (1) A base de dados estava incompleta. Alguns animais não tinham o registro do paradigma como mostrado na Figura 1a, com algumas sessões faltantes. Portanto o N de 9 animais do treino, o que já pode ser considerado relativamente baixo, foi ainda mais impactado no teste (N caiu para 6 animais).
- (2) Verificamos também que muitos eletrodos possuíam níveis altos de ruído e artefatos de movimento.
- (3) Para muitos testes estatísticos e dependendo do fenômeno analisado, o N pode ser considerado baixo, muito embora seja um número utilizado por pesquisadores da área. Isto ocorre muitas vezes pela dificuldade técnica e

- (4) O vídeo do comportamento disponibilizado possuía baixa resolução, dificultando (mas não impossibilitando) a verificação visual da exploração de objetos.
- (5) Notamos que movimentos laterais rápidos da cabeça produzem artefatos na estimativa da velocidade.

Ao término deste trabalho iremos abordar cada um dos problemas de forma a melhorar nossa investigação.

(1) Contataremos os autores da base de dados para requisitar os dados faltantes e, assim, aumentar o nosso N;

(2) Embora a presença de artefatos e ruídos seja um problema onipresente na eletrofisiologia comportamental, aplicaremos algumas técnicas para tentar melhorar o sinal, tal como re-referenciamento de eletrodos e ICA;

(3) Iremos explorar outras variáveis presentes na base de dados, tais como disparos de neurônios e sinais do córtex pré-frontal medial;

(4) Para a comparação entre treino e teste utilizaremos as componentes obtidas no sono REM e projetá-las-emos igualmente nas sessões de treino e teste;

(5) Vamos investigar diferenças nas sessões de estimulação acoplada e atrasada (controle). De acordo com o trabalho original da base de dados, somente a estimulação acoplada induz a recuperação da memória para reconhecimento de objetos.

(6) Tentaremos refazer o rastreamento 2D dos animais utilizando o corpo inteiro, e não somente o LED; evitaremos, assim, artefatos de movimentos rápidos da cabeça.

9. CONCLUSÃO

O desenvolvimento desta pesquisa atingiu o objetivo de realizar análises do acoplamento de frequência cruzada teta-gama durante uma tarefa de reconhecimento de objetos. Contudo, a pesquisa continuará em andamento afim de responder questionamentos que não foram esclarecidos por limitações na obtenção de todos os registros eletrofisiológicos, dados complementares de imagens, entre outros ajustes e adequações para melhor extração dos dados. Os objetivos específicos alcançados foram o estabelecimento de padrões de atividade oscilatória durante a fase de exploração e não exploração do objeto; a investigação do percentual de ciclos teta com gama médio durante a exploração de um objeto novo; a exploração do percentual de teta com gama lento durante a evocação de um objeto familiar e a extração e quantificação de componentes espectrais da banda de frequência teta (tSCs) durante o comportamento exploratório do animal.

Assim também, é relevante mencionar a utilização do conjunto de dados *hc-25*: “Recordings and timed stimulation of rat dorsal hippocampal area CA1 and medial prefrontal cortex during behavior and sleep (disponível em <http://crcns.org/data-sets/hc/hc-25/>) (Maingret, Girardeau, Todorova, Goutierre & Zugaro, 2016) como alternativa que viabilizou o andamento de pesquisas que investigam a dinâmica neuronal associada ao processamento da memória a partir de análises eletrofisiológicas, mesmo em circunstâncias que demandem dos laboratórios com este foco de trabalho, modos criativos e adaptados de produzir ciência.

10. REFERÊNCIAS

- Agster K.L., Burwell R.D. (2013). Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Behav Brain Res*;254:50–64.
- Ahmed, O. J., & Mehta, M. R. (2012). Running speed alters the frequency of hippocampal gamma oscillations. *J Neurosci*, 32(7373), 7383.
- Araujo, A. P. C., Lucena, J. D., Drieskens, D. C., Neves, L. R., Pugliane, K. C., Belchior, H. A., Castelo-Branco, R., & Barbosa, F. F. (2020). Rats recognize spatial and temporal attributes in a new object recognition memory task with multiple trials. *J Neurosci Methods*, 3(108936).
- Aru, J., Aru, J., Priesemann, V., Wibral, M., Lana, L., Pipa, G., Singer, W., & Vicente, R. (2015). Untangling cross-frequency coupling in neuroscience. *Curr. Opin. Neurobiol*, 31, 51–61.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2017). *Neurociências:Desvendando o sistema nervoso* (4a ed). Artmed.
- Beckstead R.M. (1979). An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J Comp Neurol*;184:43–62.
- Benchenane, K., Tiesinga, P. H., & Battaglia, F. P. (2011). Oscillations in the prefrontal cortex: A gateway to memory and attention. *Curr Opin Neurobiol*, Jun;21(3):475-85.
- Bieri, K. W., Bobbitt, K. N., & Colgin, L. L. (2014). Slow and fast gamma rhythms coordinate different spatial coding modes in hippocampal place cells. *Neuron*, 82, 670–681.
- Bragin, A., Jando, G., Nadasdy, Z., Hetke, J., Wise, K., & Buzsaki, G. (1995). Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J. Neurosci*, 15, 47–60.
- Brun, V. H., Otnass, M. K., Molden, S., Steffenach, H. A., Witter, M. P., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2002). Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science*, 21;296(5576):2243-6.
- Brun, V. H., Solstad, T., Kjelstrup, K. B., Fyhn, M., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2008). Progressive increase in grid scale from dorsal to ventral medial entorhinal cortex. *Hippocampus*, 18(12), 1200–12.
- Buzsáki, G. (2002). *Theta oscillations in the hippocampus*. *Neuron* 33,325–340.
- Buzsáki, G. (2010). Hippocampus: Network Physiology. In G. M. Shepherd & S. Grillner (Orgs.), *Handbook of Brain Microcircuits* (p. 165–174). Oxford University Press.
- Buzsáki, G., & Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, 25;304(5679):1926-9.
- Buzsaki, G., Leung, L. W., & Vanderwolf, C. H. (1983). Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res*, 287, 139–171.

- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat. Neurosci*, *16*, 130–138.
- Cabral, H. O., Vinck, M., Fouquet, C., Pennartz, C. M. A., Rondi-Reig, L., & Battaglia, F. P. (2014). Oscillatory dynamics and place field maps reflect hippocampal ensemble processing of sequence and place memory under NMDA receptor control. *Neuron*, *81*, 402–415.
- Canolty, R. T., & Knight, R. T. (2010). The functional role of cross-frequency coupling. *Trends Cogn. Sci*, *14*, 506–515.
- Chen, Z., Resnik, E., McFarland, J. M., Sakmann, B., & Mehta, M. R. (2011). Speed controls the amplitude and timing of the hippocampal gamma rhythm. *PLoS ONE*, *6*, 21408.
- Colgin, L. L. (2013). Mechanisms and functions of theta rhythms. *Annu Rev Neurosci*, *36*(295–312), 402–415.
- Colgin, L. L. (2015). Theta-gamma coupling in the entorhinal-hippocampal system. *Curr. Opin. Neurobiol*, *31*, 45–50.
- Colgin, L. L., Denninger, T., Fyhn, M., Hafting, T., Bonnevie, T., Jensen, O., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2009). Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature*, *462*, 353–357.
- Cross-frequency phase-phase coupling between q and g oscillations in the hippocampus. (2012). *J. Neurosci*, *32*, 423–435.
- Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K. D., & Buzsáki, G. (2003). Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron*, *37*, 311–322.
- Czurkó, A., Hirase, H., Csicsvari, J., & Buzsáki, G. (1999). Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by “space clamping” in a running wheel. *Eur J Neurosci*, *Jan;11(1)*:344–52.
- Delatour B., Witter M.P. (2002). Projections from the parahippocampal region to the prefrontal cortex in the rat: evidence of multiple pathways. *Eur Journal Neurosci*. ;*15*:1400–1407.
- Duncan, K., Ketz, N., Inati, S. J., & Davachi, L. (2012). Evidence for area CA1 as a match/mismatch detector: A high-resolution fMRI study of the human hippocampus. *Hippocampus*, *22*(3), 389–398.
- Dupret, D., O’Neill, J., & Csicsvari, J. (2013). Dynamic reconfiguration of hippocampal interneuron circuits during spatial learning. *Neuron*, *78*, 166–180.
- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., & Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: Is it spatial memory or a memory space? *Neuron*, *23*, 209–226.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). *A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data*. *Behav Brain Res* *31*:47–59.

- Ferbinteanu, J. (2019). Memory systems 2018—Towards a new paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory*, 157, 61–78.
- França, A. S. (2016). *O papel de oscilações beta2 e de interneurônios OLMA2 da região CA1 do hipocampo de camundongos na memória de reconhecimento de objetos*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- França, A. S., Nascimento, G. C., Lopes-dos-Santos, V., Muratori, L., Ribeiro, S., & Lobão-Soares, B. (2014). Beta2 oscillations (23-30 Hz) in the mouse hippocampus during novel object recognition. *Eur J Neurosci*, 40(11), 3693–703.
- Freeman, W. J., & A, S. C. (1985). Spatial EEG patterns, nonlinear dynamics and perception: The neo-Sherringtonian view. *Brain Research Reviews*, 10, 147–75.
- Fries, P. (2005). A mechanism for cognitive dynamics: Neuronal communication through neuronal coherence. *Trends in Cognitive Sciences*, 9, 474–480.
- Fries, P. (2009). Neuronal gamma-band synchronization as a fundamental process in cortical computation. *Annu Rev Neurosci*, 32, 209–24.
- Fyhn, M., Molden, S., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2004). Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*, 27;305(5688):1258-64.
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436, 801–806.
- Harris, K. D. (2005). Neural signatures of cell assembly organization. *Nat Rev Neurosci*, May;6(5):399-407. <https://doi.org/10.1038/nrn1669>.
- Hasselmo, M. E., Bodelon, C., & Wyble, B. P. (2002). A proposed function for hippocampal theta rhythm: Separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Comput*, 14, 793–817.
- Hill, C. S. (2010). *Consciousness*. Cambridge University Press.
- Hyafil, A., Giraud, A.-L., Fontolan, L., & Gutkin, B. (2015). Neural Cross-Frequency Coupling: Connecting Architectures, Mechanisms, and Functions. *Trends in Neurosciences*, 38, 725–740.
- Jezek, K., Henriksen, E. J., Treves, A., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2011). Theta-paced flickering between place-cell maps in the hippocampus. *Nature*, 478, 246–249.
- Knight, R. (1996). Contribution of human hippocampal region to novelty detection. *Nature*, 19;383(6597):256-9.
- Kumaran, D., & Maguire, E. A. (2007). Which computational mechanisms operate in the hippocampus during novelty detection? *Hippocampus*, 17(9), 735–48.
- Lent, R., Atheneu.Luntz-Leybman, V., Bickford, P. C., & Freedman, R. (2010). Cem Bilhões de Neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociência—2a edição. *Brain Res*, 587, 130–136.

- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2007). Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science*, 315(5814), 961–966. <https://doi.org/10.1126/science.1135801>.
- Lisman, J. E., & Grace, A. A. (2005). The hippocampal-VTA loop: Controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*, 2;46(5):703-13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.002>.
- Lopes-dos-Santos, V., Ven, G. M., Morley, A., Trouche, S., Campo-Urriza, N., & Dupret, D. (2018). Parsing Hippocampal Theta Oscillations by Nested Spectral Components during Spatial Exploration and Memory-Guided Behavior. *Neuron*, 100, 940–952 7
- M., J., & M, W. (2005). Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task. *PLoS Biology*, 3:e 402.
- Maingret, N., R., T., & Zugaro, M. (2019). *Recordings and timed stimulation of rat dorsal hippocampal area CA1 and medial prefrontal cortex during behavior and sleep. CRCNS.org*. <https://doi.org/10.6080/K0TD9VJG>
- Manns, J., & Eichenbaum, H. (2009). A cognitive map for object memory in the hippocampus. *Learn Mem*, 16, 616–624.
- Maurer, A. P., Burke, S. N., Lipa, P., Skaggs, W. E., & Barnes, C. A. (2012). Greater running speeds result in altered hippocampal phase sequence dynamics. *Hippocampus*, Apr;22(4):737-47.
- Mizumori, S. J., & Williams, J. D. (1993). Directionally selective mnemonic properties of neurons in the lateral dorsal nucleus of the thalamus of rats". *The Journal of Neuroscience*, 13(9), 4015–4028. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-09-04015.1993>.
- Montgomery, S. M., & Buzsáki, G. (2007). Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(36), 14495–500.
- Mormann, F., Fell, J., Axmacher, N., Weber, B., Lehnertz, K., Elger, C. E., & Fernandez, G. (2005). Phase/amplitude reset and theta–gamma interaction in the human medial temporal lobe during a continuous word recognition memory task. *Hippocampus*, 15, 890–900.
- Moscovitch, M. (2003). *Memory consolidation* (L. NADEL & Ed), Orgs.). Nature Publishing Group.
- Moser, E. I., Kropff, E., & Moser, M. B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci*, 31, 69–89.
- Mourão, C. A., Jr., & Melo, L. B. R. (2011). Integração de três conceitos: Função executiva, memória de trabalho e aprendizado. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 27(3), 309–314.
- Mumby, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E., & Lehmann, H. (2002). *Danos hipocampais e preferências exploratórias em ratos: Memória para objetos, lugares e contextos* (Vol. 9, Número 2). Learning & memory (Cold Spring Harbor).

- Newman, E. L., Gillet, S. N., Climer, H., JR, & M.E. (2013). Cholinergic blockade reduces theta–gamma phase amplitude coupling and speed modulation of theta frequency consistent with behavioral effects on encoding. *J Neurosci*, 33(19635), 19646.
- O’Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press.
- O’Keefe, J., & Recce, M. L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, 3, 317–330.
- O’Reilly, R. C., & Norman, K. A. (2002). Hippocampal and neocortical contributions to memory: Advances in the Complementary Learning Systems framework. *Trends in Cognitive Sciences*, 6, 505–510.
- Pastalkova E, Itskov V, Amarasingham A, Buzsa`ki G (2008) Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science* 321:1322–1327.
- Petrantonakis, P. C., & Poirazi, P. (2014). Uma perspectiva de sensoriamento comprimido da função hipocampal. *Frontiers in systems neurcience*, 8, 141.
- Restrepo, D., Arellano, J., Oliva, A. M., Schaefer, M. L., & LIN, W. (2004). Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Hormones and Behavior*, 46(3), 247–56.
- Richelle, M. (2001). *Cognição* (R. Doron & F. Parot, Orgs.). Ática.
- Scheffer-Teixeira, R., & Tort, A. B. L. (2017). *Unveiling Fast Field Oscillations through Comodulation*. 4, ENEURO.0079-17.2017.
- Scheffer-Teixeira, R., & Tort, A. B. L. (2018). Theta-gamma cross-frequency analyses (hippocampus). In D. Jaeger & R. Jung (Orgs.), *Encyclopedia of computational neuroscience* (p. 1–15). Springer.
- Schomburg, E. W. (2014). Theta phase segregation of input-specific gamma patterns in entorhinal-hippocampal networks. *Neuron*, 84, 470–485.
- Seager, M. a, Johnson, L. D., Chabot, E. S., Asaka, Y., & Berry, S. D. (2002). Oscillatory brain states and learning: Impact of hippocampal theta-contingent training. *PNAS*, 99, 1616–1620.
- Senior, T. J., Huxter, J. R., Allen, K., O’Neill, J., & Csicsvari, J. (2008). Gamma oscillatory firing reveals distinct populations of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurosci*, 28, 2274–2286.
- Siegle, J. H., & Wilson, M. A. (2014). *Enhancement of encoding and retrieval functions through theta phase-specific manipulation of hippocampus*. *ELife* 3,e03061.
- Simon, D. M., & Wallace, M. T. (2016). Dysfunction of sensory oscillations in autism spectrum disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 68, 848–861.

- Sirota, A., Montgomery, S., Fujisawa, S., Isomura, Y., Zugaro, M., & Buzsáki, G. (2008). Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron*, 60, 683–697.
- Slawinska, U., & Kasicki, S. (1998). A frequência do ritmo teta do hipocampo do rato está relacionada com a velocidade de locomoção. *Cérebro Res*, 796(1–2), 327–31.
- Squire, L. R., Stark, C. E., & Clark, R. E. (2004). The medial temporal lobe. *Annu. Rev. Neurosci*, 27, 279–306.
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253(ue 5026), 1380–1386.
- Stark, S. M., & Stark, C. E. L. (2017). Age-related deficits in the mnemonic similarity task for objects and scenes. *Behavioural Brain Research*, 333, 109–117.
- Steffenach, H. A., Sloviter, R. S., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2002). Impaired retention of spatial memory after transection of longitudinally oriented axons of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 3194–3198.
- Sutherland, R. J., Whishaw, I. Q., & Kolb, B. (1983). A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate- or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. *Behav Brain Res*, 7, 133–153.
- Theta oscillations provide temporal windows for local circuit computation in the entorhinal-hippocampal loop. (2009). *Neuron*, 64, 267–280.
- Tort, A. B. (2010). Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. *Journal of Neurophysiology*, v. 104, 1195–1210.
- Tort, A. B., Komorowski, R. W., Manns, J. R., Kopell, N. J., & Eichenbaum, H. (2009). Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106, 20942–20947.
- Tort, A. B. L., Komorowski, R., Kopell, N., & Eichenbaum, H. (2011). A mechanism for the formation of hippocampal neuronal firing patterns that represent what happens where. *Learn Mem*, 18(11), 718–727.
- Trimper, J. B., Stefanescu, R. A., & Manns, J. (2014). Recognition memory and theta–gamma interactions in the hippocampus. *Hippocampus*, 24, 341–353.
- VanElzakker, M. B., Fevurly, R. D., Breindel, T., & Spencer, R. L. (2008). Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn Mem*, 15(12), 899–908.
- Warburton, EC, & Brown, MW (2015). Circuito neural para memória de reconhecimento de ratos. *Behavioral brain research*, 285, 131–139.
- Wilson, M. A., & McNaughton, B. L. (1993). Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*, 261.

- Wu, Z., & Huang, N. E. (2009). Ensemble empirical mode decomposition: A noise-assisted data analysis method. *Adv. Adapt. Data Anal*, 1, 1–41.
- Zheng, C., Bieri, K. W., Hwaun, E., & Colgin, L. L. (2016). Fast gamma rhythms in the hippocampus promote encoding of novel object-place pairings. *ENeuro*, 3, 3089–3096.
- Zola-Morgan, S. M., & Squire, L. R. (1990). A formação do hipocampo dos primatas: Evidência de um papel limitado no tempo no armazenamento de memória. *Ciência*, 250(4978), 288–90.