

## **CAPA PADRÃO PARA CD**

Nome aluno:	Cesar Augusto de Oliveira Coelho
Curso:	Ciencias Biológicas – Bel/Lic
Título do trabalho:	Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esquiiva inibitória.
Orientador:	Maria Gabriela Menezes de Oliveira
Co-orientador:	
Supervisor:	Silvia Mitiko Nishida
Depto onde foi realizado:	Dpto. de Psicobiologia
Instituição:	UNIFESP
Conclusão (mm/aaaa):	12/2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS*

Coelho, César Augusto de Oliveira.

Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esquiva inibitória / César Augusto de Oliveira Coelho. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Maria Gabriela Menezes de Oliveira

1. Eletroencefalografia 2. Sono - Privação

Palavras-chave: Aprendizagem; Eletroencefalografia; Memória; Privação de sono; Sono

*Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esquiva inibitória*

---

Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

**COMPARAÇÃO DE REGISTROS DE SONO (EEG E EMG)  
LIDOS EM ÉPOCAS DE 10 E 30 SEGUNDOS DE RATOS  
SUBMETIDOS A PRIVAÇÃO DE SONO E TAREFA DE ESQUIVA  
INIBITÓRIA**

Cesar Augusto de Oliveira Coelho

**Botucatu**

**2009**

*Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esquiva inibitória*

---

**Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esquiva inibitória**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte das atividades para obtenção do título de bacharel do curso de Ciências Biológicas da UNESP, IB, Botucatu

Prof<sup>a</sup> orientadora: Maria Gabriela Menezes de Oliveira

**Botucatu**

**2009**

**Coelho, CAO. Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esquiva inibitória.** Botucatu, Xp. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista

<b>Os pareceristas, abaixo listados, consideram este trabalho aprovado.</b>			
	<b>Nome</b>	<b>Titulação</b>	<b>Instituição</b>
<b>1</b>	Maria Gabriela Menezes de Oliveira	Professora Adjunta	Universidade Federal de São Paulo
<b>2</b>	Silvia Mitiko Nishida	Prof. Assistente Doutor	Universidade Estadual Paulista
<b>3</b>	Debora Hipólido	Professora Adjunta	Universidade Federal de São Paulo

*Dedico este trabalho a todos aqueles que, de alguma forma, em algum dia de suas vidas contribuíram para que o conhecimento se tornasse um valor de tamanha magnitude em minha vida. Que eu possa fazer o mesmo por alguém um dia.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Prof. Dr. Silvia Mitiko  
Nishida e a Prof. Dr. Maeli Dal Pai Silva.  
Agradeço a minha mãe, Madalena Maria de  
Oliveira.*

*“Não existe caminho para a felicidade. A  
felicidade é o caminho”.*

*Mahatma Gandhi*

## **RESUMO**

Objetivo do presente trabalho foi comparar parâmetros como o tempo total, número de episódio e duração média de episódios em cada fase do ciclo sono-vigília, e sequências de fases em registros eletroencefalográficos lidos em épocas de 10 e 30 segundos em animais controles e privados de sono paradoxal submetidos a uma tarefa de aprendizagem e memória aversiva. Esta comparação almejou discutir a necessidade de épocas menores na leitura de EEGs , e da busca de maiores detalhes e e sequências mais curtas, presentes em muitos estudos atualmente.

Palavras-chave: Sono; Memória; Eletroencefalografia; Privação de sono; Aprendizagem.

## **ABSTRACT**

The objective of the present study was to compare parameters such as total time, number of episodes and mean duration of episodes of each wake-sleep cycle stage, and sequences of stages in electroencephalographic records scored in 10 and 30 seconds epochs in controls and sleep deprived animals, submitted to avoiding tasks of learning and memory. This comparing tried to discuss the need of lesser epochs in the EEG scoring, and of the search for more details and shorter sequences, present in many studies nowadays.

## SUMÁRIO

<b><i>CAPÍTULO 1</i></b>	<b>1</b>
1.1 Introdução	1
1.1.2 Hipótese Sequencial	3
1.2 Objetivo deste estudo	6
<b><i>CAPITULO 2</i></b>	<b>7</b>
<b>1. Material e Métodos</b>	<b>7</b>
1.1 Animais	7
1.2 Implante de eletrodos para registro de sono	7
1.3 Registro de sono	8
1.4 Privação de sono	8
1.5 Procedimento comportamental	9
Esquiva inibitória por múltiplas tentativas (EIMT)	9
1.6 Análise dos registros	10
1.6.1 Parâmetros de sono e vigília	10
1.7 Delineamento experimental	11
1.8 Análise estatística	15
Comparação entre registros lidos em épocas de 10s e 30s	15
Parâmetros gerais de sono e vigília e análises sequenciais	15
<b><i>CAPITULO 3</i></b>	<b>16</b>
1.1 Resultados	16
1.2 Discussão	21
1.3 Considerações Finais	25
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>27</b>
<b>Anexos</b>	<b>32</b>

## CAPÍTULO 1

### 1.1 Introdução

Muitos estudos têm mostrado que existe relação entre sono e memória. Várias evidências sugerem que o sono tem um papel facilitatório sobre a consolidação de traços mnemônicos recentemente adquiridos e a aquisição de novas informações, por sua vez, também modificam o padrão de sono subsequente (Walker e Stickgold, 2004; Maquet e cols., 2003; Smith e cols., 2004).

Desde a descoberta do sono REM (do inglês *Rapid Eye Movement*) ou sono paradoxal (SP), por Arserinsky e Kleitman em 1953, os estudos relacionando sono e memória deram mais ênfase a essa fase de sono, incluindo os trabalhos realizados em nosso laboratório (Hennevin e Leconte, 1971; Fishbein e Gutwein, 1997; Crick, 1983; Smith e cols., 1995, 1998; Moreira e cols, 2003; Bueno e cols., 1994; Dubiela e cols., 2005). Mais recentemente observou-se que algumas manipulações também induzem alterações nas fases de sono não-REM (NREM) e, dessa forma, esta fase do sono também começou a receber mais atenção no que diz respeito ao papel do sono em processos de aprendizagem e memória (Stickgold e cols., 2000; Gais e cols., 2002; Walker e cols., 2002; Robertson, 2004).

Ambos REM e NREM são caracterizados por eventos eletrofisiológicos únicos. O sono NREM ou sono sincronizado caracteriza-se por atividade elétrica cerebral síncrona com elementos próprios como: fusos, complexos K e ondas de grande amplitude, e é dividido, em humanos, em 3 fases ou estágios, segundo o aumento de sua profundidade (Silber et al, 2007): estágio 1, estágio 2 e estágio 3 ; estes últimos também denominados de sono delta ou sono de ondas lentas (SOL), com predomínio de um padrão de frequência baixa e alta amplitude, conhecido como ritmo delta (0,4 a 4 Hz). Esta fase ocupa a maior porção do período do sono, aproximadamente 75% a 80% e o período do sono de REM, aproximadamente 20% sobre o sono total (Madsen e Vorstrup, 1991).

O sono REM não é dividido em fases, no entanto apresenta algumas características que são divididas em eventos fásicos e tônicos. Os eventos fásicos são intermitentes, representados pelos movimentos oculares, abalos musculares e ondas ponto-geniculo-occipitais (PGO); os eventos tônicos são persistentes, tais como: atonia muscular, dessincronização cortical e ritmo theta-hipocampal (Aserinsky e Kleitman, 1953). Em ratos foi observada uma forte semelhança com o sono humano (Timo-laria e cols., 1970). O sono NREM é caracterizado pela presença de fusos e de ondas delta, que também ocorrem nas áreas frontais do cérebro do rato e a quantidade de SP é diretamente comparável à quantidade de sono REM em humanos. A porcentagem de SP observada em ratos durante o tempo total de sono é similar àquela verificada em humanos em um período de 8 horas de sono, ou seja, 18% (Hoshino, 1972). Vale ressaltar que, no rato, as ondas PGO não estão presentes, mas sim ondas P e a denominação “sono REM e NREM” não são as mais adequadas para o estudo do sono, visto que o movimento das vibrissas é mais claro e freqüente do que os movimentos rápidos dos olhos (Timo-laria e cols., 1990). Logo adotamos a denominação sono paradoxal (SP) e sono de ondas lentas (SOL) para referir aos estágios de sono em ratos.

Muitos dos fenômenos elétricos associados ao sono têm sido implicados no processo de plasticidade e de aprendizagem por suportar mecanismos de potenciação sináptica. Muitos trabalhos têm relacionado o aumento de fusos com o desempenho em tarefas dependentes de sono (Fogel e cols., 2001; Walker e cols., 2002). Eventos fásicos durante o SP também têm sido associados com aprendizagem. Datta (2000) mostrou que a freqüência de ondas P durante o SP está associada positivamente com o desempenho de ratos na tarefa de esquiva ativa. Sanford e cols. (2001) mostraram também que o condicionamento de medo aumenta a amplitude de ondas P durante o SP, relacionando esses eventos com aprendizagem. Em humanos, Maquet e colaboradores (2000) demonstraram que o padrão de atividade eliciado quando os sujeitos são submetidos a uma tarefa motora, que avalia o tempo de reação (*memory reaction time test*) antes do sono, reaparece durante os episódios de sono SP subseqüentes, enquanto que esse

replay não aparece nos sujeitos do grupo controle, que não foram submetidos ao treino.

### **1.1.2 Hipótese Sequencial**

Estudos que mostram que o sono ou elementos presentes durante o período de sono de alguma forma interferem com processamento de memória levaram ao surgimento de várias teorias. Em geral estas teorias dão ênfase à importância de uma ou de outra fase do sono na memória (Walker e cols., 2002; Smith e cols., 2004, Karni e cols., 1994). Uma das teorias mais recentes afirma, entretanto, que não apenas cada estágio do sono isoladamente seria importante para memória, mas prevê a importância da sucessão ordenada de SOL e SP para a consolidação da memória. Esta teoria, chamada de teoria seqüencial ou “*double-step hypothesis*” (Giuditta e cols., 1995), vem ganhado muita atenção recentemente. Dessa forma ambos os estágios de sono parecem necessários para consolidação da memória e SP e SOL se complementaríamos refletindo diferentes processamentos neurais que transformariam traços lábeis em traços mais estáveis. As duas maiores premissas dessa hipótese são:

O envolvimento do SOL no processamento cerebral de informações como um primeiro passo necessário para que o segundo passo do processamento ocorra durante o SP;

A qualidade e quantidade de consolidação de memórias adquiridas durante um período de vigília prévio dependem dos eventos que ocorrem durante o sono subsequente.

Essa hipótese surgiu a partir da observação de que ratos treinados em uma tarefa de esquiva ativa apresentaram um aumento significativo na média da duração dos episódios de SOL após a sessão de treino em comparação com animais controles e em relação ao seu basal. Além disso, os ratos que atingiram o critério de aprendizagem (ratos *fast learning*, ou FL) apresentaram esse efeito a partir da primeira hora pós-treino e, analisando episódios de SOL seguido de vigília (SOL-V) ou de SOL seguido de SP (SOL-SP), foi visto que o primeiro padrão seqüencial dura

pouco tempo e o segundo se manifesta durante todo o período após a sessão de treino. Por outro lado, os ratos que não atingiram o critério de aprendizagem (ratos *non-learning*, ou NL) apresentam aumento da duração dos episódios SOL-V durante todo o período pós-treino enquanto que um efeito similar nos episódios de SOL-SP apareceu somente a partir da segunda hora pós-treino. Em suma, nos animais que aprendem rápido há um predomínio de SOL-SP ao passo que nos que aprendem lentamente ocorre um predomínio da seqüência SOL-V durante o período pós-treino (Ambrosini e cols., 1992).

Fortalecendo a hipótese seqüencial, a descoberta da reativação neuronal durante o sono também corrobora a noção de que novos traços mnemônicos devem ser reverberados nas suas redes neurais até que a plasticidade sináptica possa efetivar a consolidação desses traços (Hebb, 1949; Gutwein e cols., 1980; Winson, 1985; Ribeiro e cols., 1999). Em vários experimentos mostrou-se que a atividade neural expressa durante a vigília é reinstalada durante as diversas fases do sono. Pavlides, em 1989, mostrou que as células de lugar hipocâmpais (ou *place cells*) apresentam maior taxa de disparo durante todo o período de sono quando pré-expostas a uma estimulação prévia do que células não pré-expostas. Outros pesquisadores também mostraram que as *place cells*, altamente estimuladas em uma tarefa espacial, são reativadas durante o SOL e SP subseqüentes e que esse disparo é temporalmente correlacionado com o padrão temporal de disparo no momento do treino da tarefa (Skaggs e McNaughton, 1996; Louie e Wilson, 2001).

Ao mesmo tempo, a própria caracterização dos estágios (e ciclos) do sono é questionada por Benington (1994). Segundo ele, a distribuição temporal do sono REM é mais complexa do que uma oscilação simples em intervalos regulares, e exemplos disso seriam estudos com humanos e ratos, nos quais episódios de sono REM não são classificados como tal a menos que eles tenham uma duração mínima, e dois segmentos de sono REM não são considerados distintos a menos que um segmento qualquer entre eles tenha uma duração mínima.

Por outro lado, a partir do fato de que o ciclo do sono em ratos tem uma duração máxima de 10 minutos (Weiss, 1964, Van Twyver, 1969). A maioria dos estudos de arquitetura do sono em ratos consideram épocas de 30-60 segundos,

fazendo com que os episódios não sejam classificados a menos que tenham um mínimo de 15-30 segundos. Estudos feitos classificando os estágios do sono com épocas de 4 segundos resultaram em muitos ciclos de sono com menos de 2 minutos de duração e uma média muito menor que 10 minutos (Trachsel et al, 1991). Para que o ciclo de sono atingisse a média de 10 minutos foi preciso adotar o critério de considerar como sono REM apenas episódios que durassem 8 épocas seguidas (32 segundos).

Episódios de sono REM em ratos são comumente abortados depois de seu início. Em tais casos, todos os marcadores clássicos de sono REM (atividade  $\theta$  hipocampal no EEG, atonia no EMG, ondas P aumentadas) estão presentes por um curto período de tempo (5-20 segundos), seguidos por um aumento transitório de vigília e, mais comumente, por sono NREM (Benington, 1994). Em ambos tempos de episódios de sono REM, breves e duradouros, são precedidos por um estágio intermediário do sono NREM, tornando-se um período de transição entre o sono NREM e o sono REM (McCarley e cols, 1970 e Gottesmann e cols, 1984). Esta fase é caracterizada por uma baixa atividade de ondas lentas ( $\delta$ , 0.4-5Hz), ondas  $\theta$  (6-9Hz) e  $\sigma$  (10-14Hz) aumentadas, progressivo decréscimo de tônus muscular e largos e isolados picos de ondas PGO (Gottesmann 1992, Gottesmann e cols., 1984, Ruigt GSF e cols., 1989, e Trachsel e cols., 1988).

Então, se uma quantidade muito grande de episódios de sono REM breves ocorrerem durante o período todo, essas pequenas partes podem, somadas, se tornar significativas para a estrutura do período total do sono. É uma análise que as negligencia, não refletiria o tempo de sono REM com precisão.

Além disso, no estudo dentro da hipótese sequencial, uma caracterização da estrutura do sono que considera os breves episódios de REM torna-se muito importante, pois o fato de os eventos prévios para os episódios de sono REM serem os mesmos, independente de sua duração, sugere que a importância de ambos para a estrutura do sono e para os processos que ocorrem no momento também seja a mesma.

## **1.2 Objetivo deste estudo**

A partir deste contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar a caracterização da estrutura do sono de ratos submetidos a privação de sono e à tarefa de Esquiva Inibitória por Múltiplas tentativas em segmentos (épocas) de 30 segundos (comumente usado) e de 10 segundos.

## **CAPITULO 2**

### **1. Material e Métodos**

#### **1.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos de 2-3 meses de idade, provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia (UNIFESP). Os ratos foram mantidos em gaiolas, com livre acesso a água e comida, em sala com temperatura ( $23 \pm 2$  °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00h).

#### **1.2 Implante de eletrodos para registro de sono**

Os eletrodos foram confeccionados a partir de conectores de informática (modelo FC - 14) e fios de níquel - cromo revestidos com Teflon® (California Fine Wire) de 0,008 mm para o registro eletrocorticográfico (ECoG) e de 0,004mm para o registro eletromiográfico (EMG). Os animais foram pesados, e a indução anestésica feita com diazepam (5,5 mg/kg i.p.) e cloridrato de Ketamina® (140 mg/kg i.p.). Os animais foram fixados em aparelho estereotáxico (modelo David Kopf) para o implante de eletrodos. As coordenadas foram seguidas de acordo com Bergmann (1989):

- a) 1 mm posterior ao bregma, 3mm à esquerda da sutura sagital;
- b) 3 mm anterior ao bregma, 1 mm à direita da sutura sagital;
- c) 1 mm anterior ao lambda, 4 mm à esquerda da sutura sagital;
- d) 4 mm anterior ao lambda, 1 mm à direita da sutura sagital.

Para registro eletromiográfico, um par de eletrodos foi implantado no músculo do pescoço desses animais. O implante foi fixado com acrílico odontológico de polimerização rápida, e após a cirurgia, os animais receberam 0,5 ml/kg de Pentabiótico® (Wyeth) i.m. para evitar infecção, e 10 mg/kg de diclofenaco sódico

i.p. (25mg/ml) para indução de analgesia e redução de processos inflamatórios. Após a recuperação anestésica, os animais ficaram alojados individualmente em gaiolas cúbicas de acrílico transparentes (34 cm de altura x 31,5 cm de largura x 31,5 cm de profundidade) forradas com serragem. Os ratos ficaram em recuperação do processo cirúrgico por um período de 5-7 dias.

### **1.3 Registro de sono**

O sono dos animais foi registrado em polígrafos digitais Nihon-Kohden® (modelo QP - 223A). Cada animal foi conectado através de 3 canais, sendo dois para o registro do ECoG e o terceiro para o registro do EMG.

### **1.4 Privação de sono**

A privação de sono paradoxal foi realizada pelo método das plataformas múltiplas modificado (MPMM), que consiste em alojar até 10 animais sobre quatorze plataformas estreitas (6,5 cm de diâmetro) colocadas no interior de um tanque de aço inox (147 cm de comprimento x 44 cm de largura x 45 cm de altura) preenchido com água até uma altura de 1 cm abaixo da superfície das plataformas (Suchecki e Tufik, 2000). Os animais são, desta forma, obrigados a permanecer sobre as plataformas; ao iniciar o SP, podem cair na água, devido à atonia muscular que acompanha esta fase de sono, sendo, então, acordados.

**Figura1:** Esquema ilustrativo do método de privação de sono paradoxal por plataformas múltiplas modificado.



## 1.5 Procedimento comportamental

### *Esquiva inibitória por múltiplas tentativas (EIMT)*

Os animais foram colocados individualmente no compartimento claro da caixa de esquiva (compartimento seguro) e, após 10 segundos, a porta que dá acesso ao compartimento escuro se abria. A latência para o animal entrar no compartimento escuro foi medida e, assim que o animal atravessava a porta com as 4 patas, esta foi fechada e foi liberado 1 choque de 0,7 mA, com duração de 1 segundo. Imediatamente após o choque, o animal foi removido da caixa e recolocado no compartimento claro da caixa de esquiva. Esse procedimento se repetiu até que o animal atingisse o critério de permanecer na caixa clara por 120 segundos. Cada latência e o número de tentativas necessário para o critério foram anotados.

Na sessão de teste os animais foram colocados novamente no compartimento claro da caixa de esquiva e, 10 segundos depois, a porta que dá acesso ao compartimento escuro se abria, sendo anotado o tempo para o animal entrar no compartimento escuro com as 4 patas. Os animais que não atravessaram para o compartimento escuro dentro de 300 segundos foram removidos do aparato, e uma latência de 300 segundos foi registrada. Nenhum choque foi liberado durante o teste. O número de tentativas para atingir o critério na sessão de treino foi

considerada a medida da aquisição da tarefa. A latência na sessão de teste, comparada com a primeira latência na sessão de treino, foi considerada como a medida de retenção/consolidação da tarefa.

## **1.6 Análise dos registros**

A leitura dos registros foi realizada através do programa SleepScorer, desenvolvido por Gross e cols (2009), dentro do software Matlab®, em épocas de 30 e 10 segundos. Os registros de sono foram analisados visualmente pelo experimentador, em ambas as épocas, com confirmação pela distribuição das frequências das bandas  $\delta$  (delta),  $\theta$  (theta),  $\sigma$  (sigma) e EMG, e a classificação dos estágios do sono foi feita de acordo com Timo-laria e cols. (1970) e Giuditta e cols, (1995), sendo determinados: vigília (V), sono de ondas lentas (SOL), sono paradoxal (SP) e sono de transição (ST). Os filtros utilizados para as bandas  $\sigma$  (delta),  $\delta$  (theta),  $\theta$  (sigma) foram 0,4-4 Hz, 5-9 Hz, 10-14 Hz, respectivamente. Durante o estagiamento visual, as épocas eram classificadas de acordo com o estado predominante (mais que 50% da época). Épocas nas quais não foi possível realizar a identificação foram lidas como não-identificadas.

### **1.6.1 Parâmetros de sono e vigília**

Os parâmetros gerais foram realizados no Matlab e foram quantificados os parâmetros:

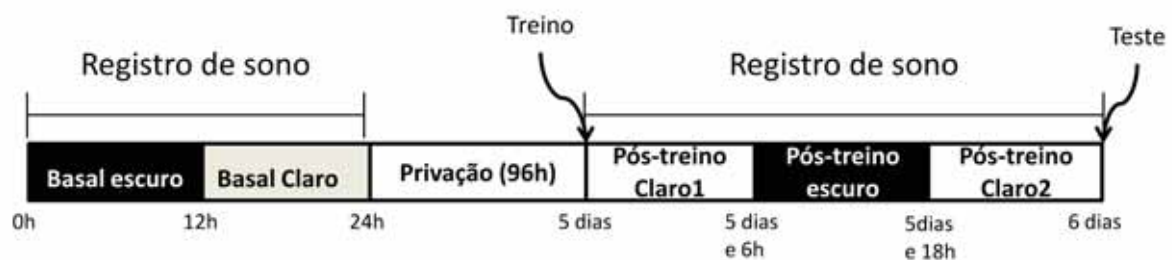
- tempo total gasto em cada estágio;
- número de episódios para cada estágio;
- duração média de episódios para cada estágio;
- Número total de seqüências entre 2 estágios, considerando todas as transições possíveis: SOL-SP, SOL-ST, SOL-V, ST-SOL, ST-SP, ST-V, SP-SOL, SP-ST, SP-V, V-SOL, V-ST, V-SP;

-Número total de seqüências identificadas como SOL-ST-SP, independentemente da duração de cada estágio isoladamente;

- Número total de seqüências identificadas como SOL-ST-V, independentemente da duração de cada estágio isoladamente;

### 1.7 Delineamento experimental

Os animais foram registrados por 24 horas logo após o período de recuperação da cirurgia de implantação de eletrodos (registro basal). Em seguida, os animais foram divididos em dois grupos; controles (C) e privados de sono(PS). Após o registro basal todos os animais foram habituados ao tanque de privação por 1 hora por dia durante 2 dias. Após o período de habituação os animais do grupo PS foram colocados no tanque de privação e permaneceram por 96 horas. Os animais do grupo C continuaram sendo colocados no tanque de privação diariamente por 1 hora até o momento do treino da tarefa de EIMT. Após o período de 96 horas de privação de sono todos os animais saíram do tanque de privação e foram treinados na tarefa. Imediatamente após o treino os animais foram submetidos ao registro até o momento do teste, 24 horas depois.



**Figura 5:** Esquema do delineamento do experimento.

Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esquila inibitória

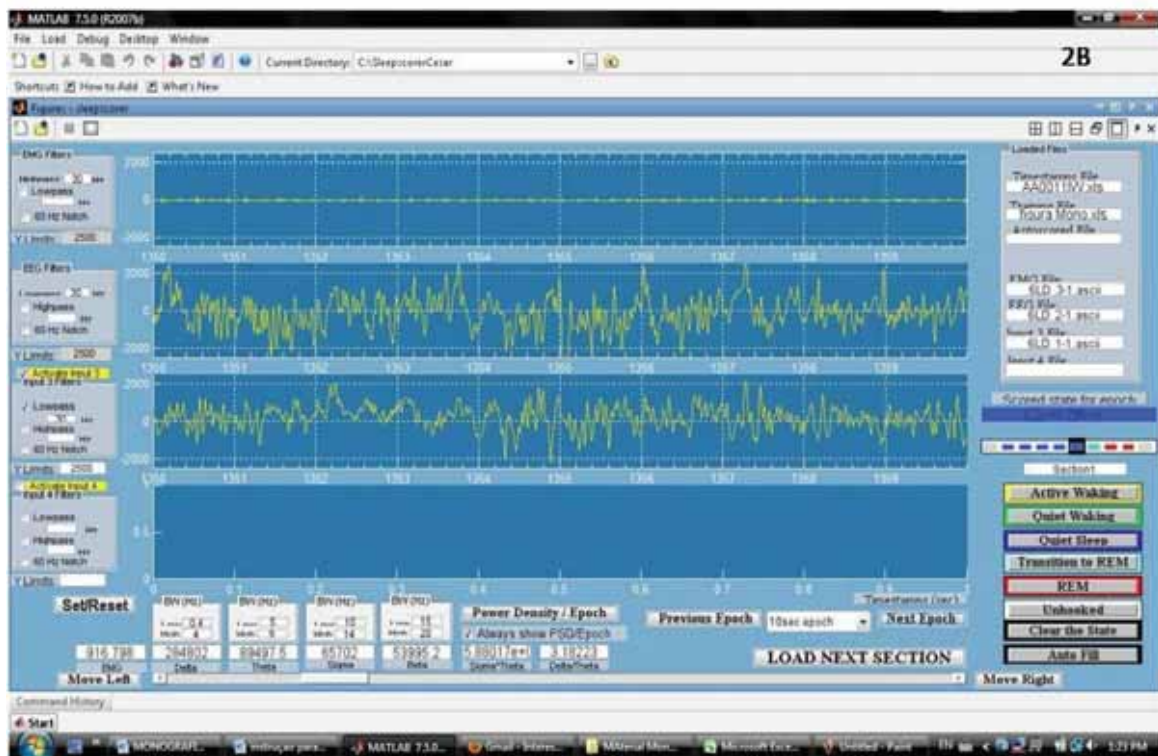
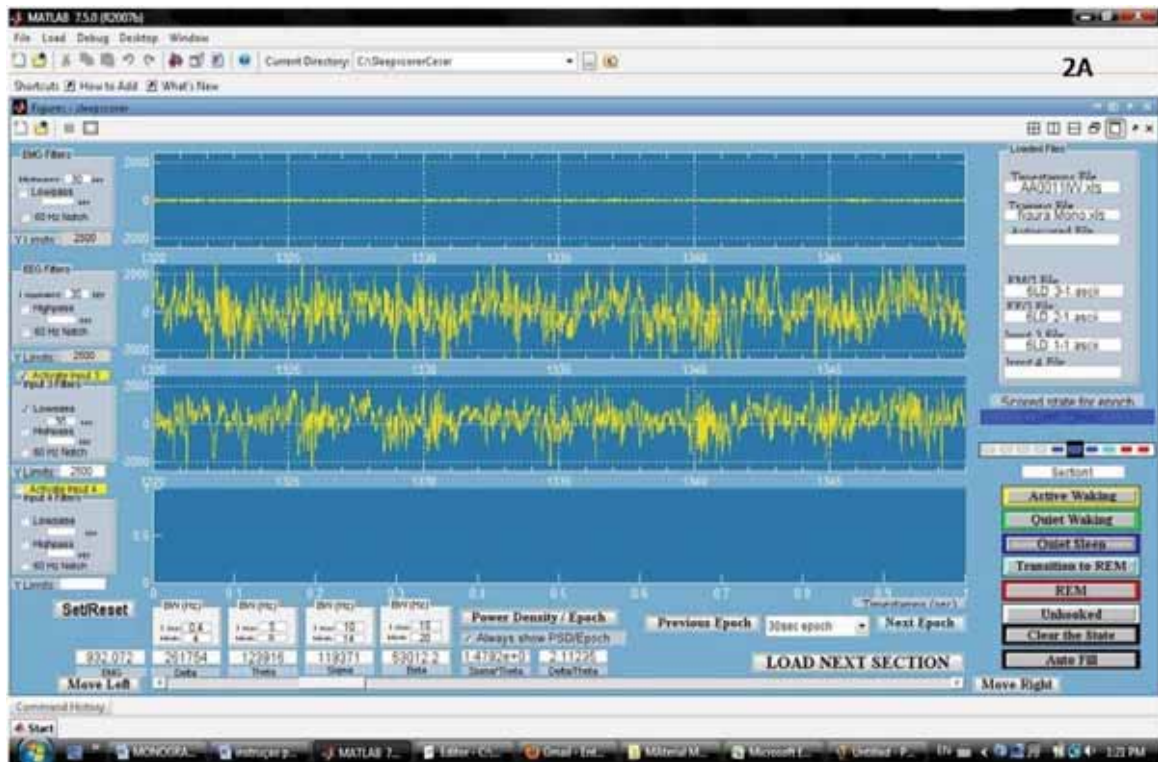


Figura 2: Exemplo de uma época de 30s(A) e 10s (B) classificando sono de ondas lentas. Os canais, de cima para baixo, são EMG, EEG hipocampal e ECoG (cortex frontal).

Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esQUIVA inibitória

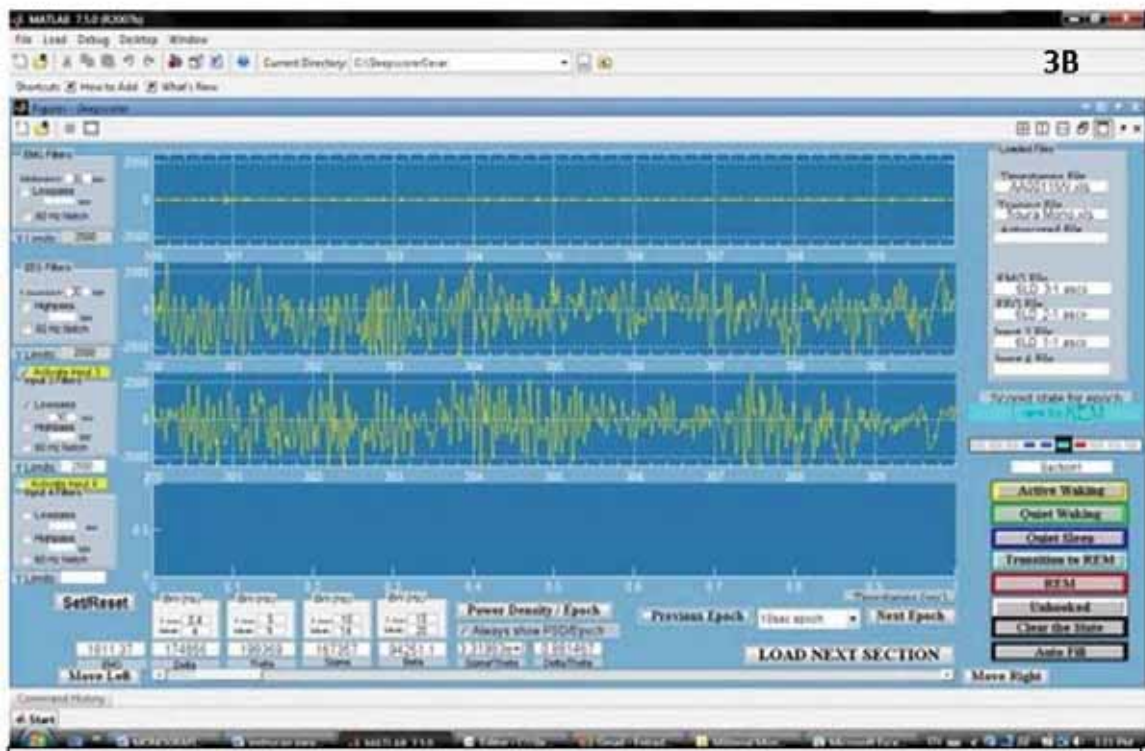
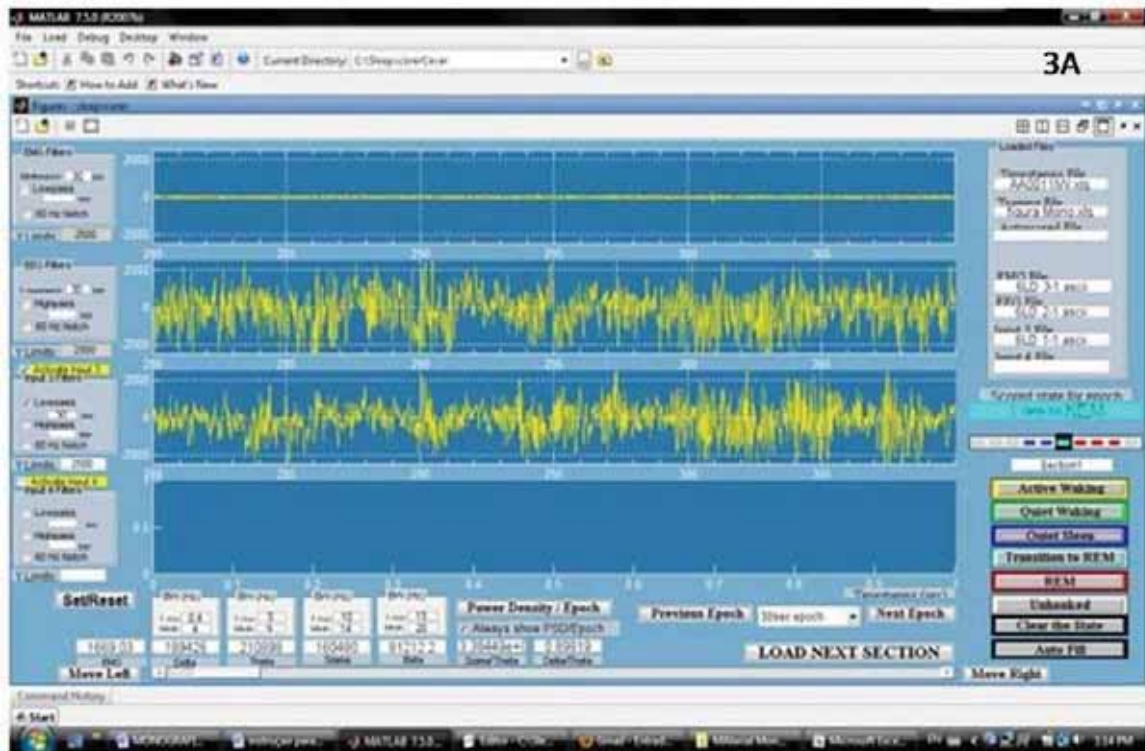


Figura 3: Exemplo de uma época de 30s(A) e 10s (B) classificando sono de transição. Os canais, de cima para baixo, são EMG, EEG hipocampal e ECoG (cortex frontal).

Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esQUIVA inibitória

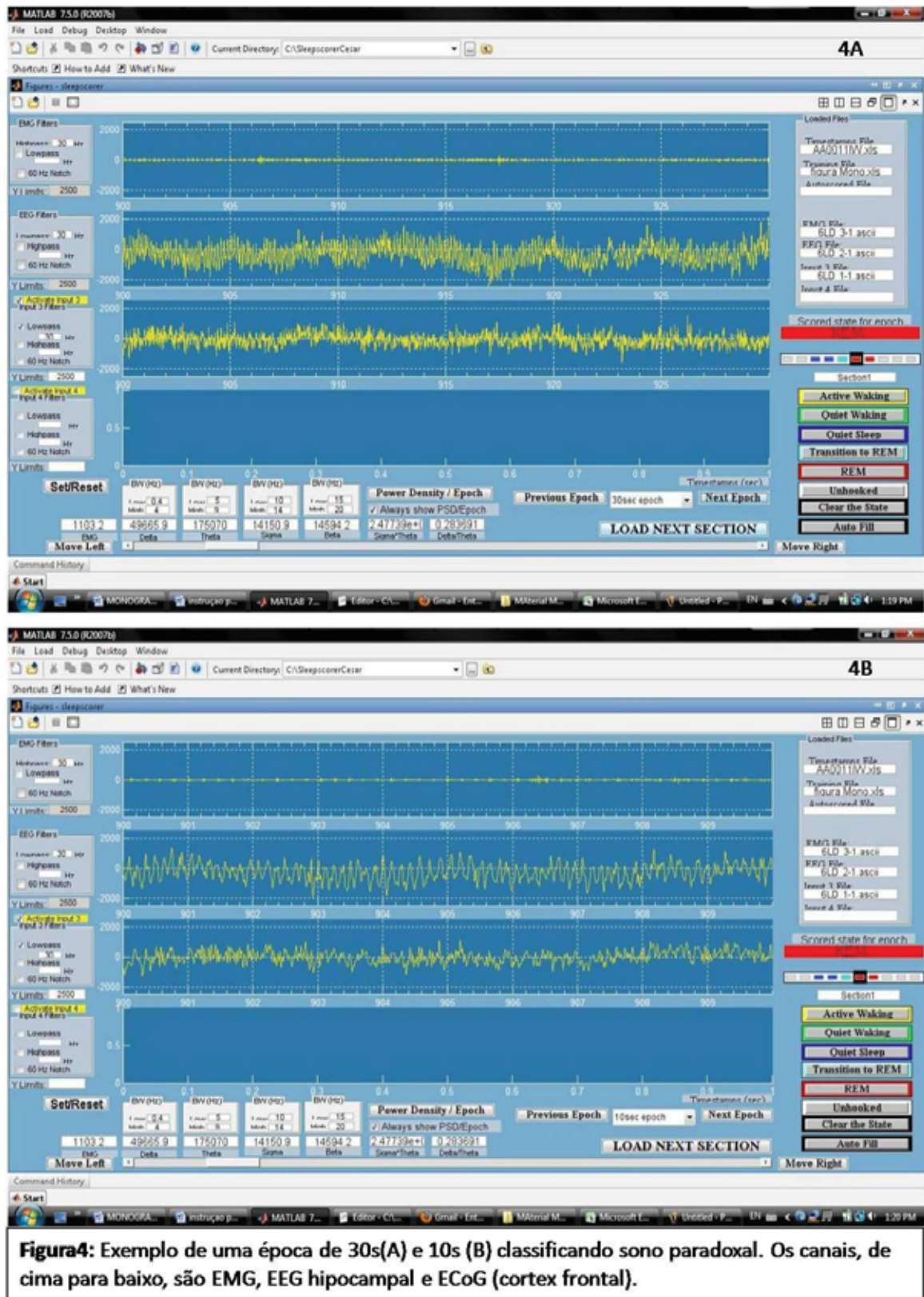


Figura4: Exemplo de uma época de 30s(A) e 10s (B) classificando sono paradoxal. Os canais, de cima para baixo, são EMG, EEG hipocampal e ECoG (cortex frontal).

## **1.8 Análise estatística**

### ***Comparação entre registros lidos em épocas de 10s e 30s***

Um teste inicial de concordância entre as duas leituras foi feita por um teste kappa seguido de um teste-t de uma amostra, com os valores de kappa, para cada período de registro (basal claro, 7:00am -7:00pm; basal escuro, 7:00pm-7:00am; pós-treino claro1, 1:00pm-7:00pm; pós-treino escuro 7:00pm-7:00am; pós-treino claro2, 7:00am-1:00pm).

Uma análise da porcentagem de concordância de cada estágio em relação à leitura em 30s (número de leituras concordantes em 10s e 30s/Total das leituras em 30s) de cada período de registro para cada animal através de um teste binomial também foi feita.

### ***Parâmetros gerais de sono e vigília e análises sequenciais***

As análises do Número de Episódios, Tempo Total de Estágio, Duração Média de Episódios e das sequências foram realizadas por meio de um teste de confiabilidade (*reliability test*) com um coeficiente de correlação intraclassa para cada parâmetro e sequência, comparando-se as épocas de 10s e 30s.

O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$  para todas as análises.

## CAPITULO 3

### 1.1 Resultados

Para a análise da concordância entre as leituras, os testes-t de uma amostra dos valores de kappa apresentaram, todos, valores de significancia  $p \leq 0,05$ . (Quadro 1).

**Quadro 1:** Teste-t de uma amostra para os valores de kappa em cada período.

Animal/kappa	Basal Escuro	Basal Claro	Pós-treino Claro1	Pós-treino Escuro	Pós-treino Claro2
1	0.762	0.734	0.78	0.775	0.586
2	0.828	0.747	0.757	0.786	x
3	0.715	0.639	0.624	0.579	0.589
4	0.775	0.79	0.762	0.728	0.831
5	0.696	0.635	0.38	0.265	0.615
6	0.695	0.662	0.723	0.705	x
7	0.553	0.597	0.49	0.375	0.454
<b>Média</b>	0.718*	0.709*	0.645*	0.602*	0.615*
<b>Erro Padrão</b>	0.323	0.268	0.059	0.781	0.061
<b>Valor-p</b>	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	0.05

O quadro mostra os coeficientes de concordância ( valores de kappa) da comparação entre leituras em cada período. (\* $p < 0,05$ ).

A figura 6 ilustra as médias das porcentagens de concordância de cada estágio em relação à leitura de 30s, para cada período de registro. Com exceção do ST, todos os outros obtiveram uma concordância estatisticamente significativa em todos os períodos.

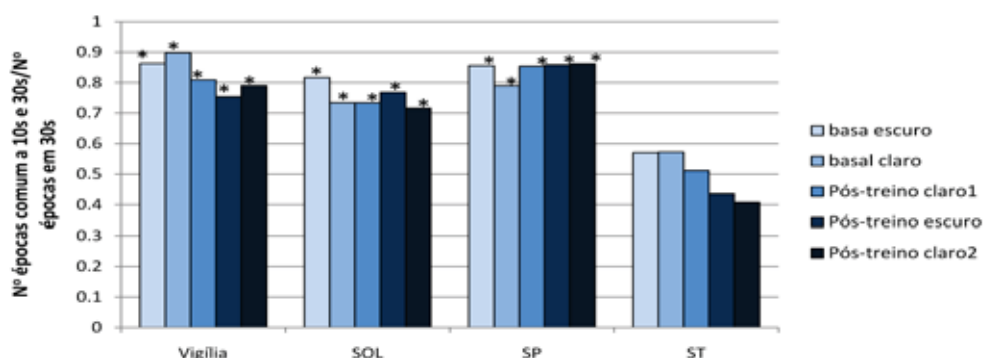


Figura 6: Teste Binomial das porcentagens de concordância relativas a 30s (Número comum a 10s e 30s/ Número de épocas em 30s) de cada estágio em cada período (\*p<0,00001).

**Quadro 2:** Coeficientes de correlação intraclasse dos Números de Episódios de cada estágio em cada período.

		Médias		Coeficiente de Correlação Intraclasse	valor-p	
		10s	30s			
<b>Basal Escuro</b>	Vigília	304.0	109.4	0.650	0.040	*
	SOL	290.3	110.9	0.679	0.032	*
	ST	92.4	38.0	0.700	0.027	*
	SP	50.6	33.0	0.892	0.001	*
<b>Basal Claro</b>	Vigília	313.9	104.9	0.672	0.034	*
	SOL	258.0	107.9	0.676	0.033	*
	ST	74.1	30.7	0.664	0.003	*
	SP	49.4	29.9	0.861	0.036	*
<b>Pós-Treino Claro1</b>	Vigília	127.9	32.6	0.040	0.463	
	SOL	126.4	46.4	-0.042	0.539	
	ST	71.6	36.9	0.623	0.031	*
	SP	68.0	35.6	0.684	0.049	*
<b>Pós-Treino Escuro</b>	Vigília	250.0	71.4	0.414	0.154	
	SOL	242.3	81.6	0.210	0.309	
	ST	87.3	43.0	0.753	0.003	*
	SP	66.0	39.6	0.856	0.016	*
<b>Pós-Treino Claro2</b>	Vigília	155.0	44.4	0.652	0.080	
	SOL	131.8	54.8	0.552	0.128	
	ST	40.8	24.6	0.928	0.004	*
	SP	28.0	20.8	0.954	0.002	*

Este quadro apresenta as médias do número de episódios nas leituras em 10s e 30s, respectivamente, de cada estágio em cada período; o coeficiente de Correlação intraclasse e o valor-p do teste de confiabilidade (\*p<0,05).

Os quadros 2,3,4 e 5 mostram os coeficientes de correlação intraclasse de cada estágio em cada período, com os respectivos valores-p e as médias para os seguintes parâmetros, respectivamente: Número de Episódios, Duração Média de Episódio, Tempo Total de Estágio e Número de Sequências. Este último contém todas as sequências possíveis entre 2 estágios e as sequências SOL-ST-SP e SOL-ST-V, independente da duração de cada estágio na sequência. Na análise de Número de Episódios (Quadro 2), a correlação intraclasse não foi considerada significativa para a V e SOL de todos os períodos pós-treino.

**Quadro3:** Coeficiente de Correlação Intraclasse do Tempo total dos estágio por período.

		Médias (min.)		Coeficiente de Correlação Intraclasse	valor-p	
		10s	30s			
Basal Escuro	Vigília	390.00	405.86	0.984	0.000	*
	SOL	229.21	218.64	0.961	0.000	*
	ST	29.02	21.14	0.802	0.008	*
	SP	45.31	46.43	0.971	0.000	*
Basal Claro	Vigília	432.64	431.29	0.992	0.000	*
	SOL	201.50	224.71	0.997	0.000	*
	ST	21.33	17.43	0.894	0.001	*
	SP	47.29	48.00	0.996	0.000	*
Pós-Treino Claro1	Vigília	99.21	69.71	0.494	0.107	
	SOL	114.48	129.29	0.764	0.014	*
	ST	23.17	23.64	0.783	0.011	*
	SP	75.00	78.50	0.992	0.000	*
Pós-Treino Escuro	Vigília	279.95	253.50	0.666	0.036	*
	SOL	196.71	195.07	-0.211	0.692	
	ST	23.62	25.29	0.952	0.000	*
	SP	67.95	67.43	0.995	0.000	*
Pós-Treino Claro2	Vigília	143.03	96.90	0.67	0.073	*
	SOL	96.70	118.90	0.743	0.045	*
	ST	9.90	14.70	0.809	0.026	*
	SP	31.17	32.00	0.982	0.000	*

Este quadro apresenta as médias do tempo total dos estágios (em minutos) nas leituras em 10s e 30s, respectivamente, por período; o coeficiente de Correlação intraclasse e o valor-p do teste de confiabilidade (\*p<0,05).

Um padrão diferente de correlação foi encontrada na análise do Tempo Total dos estágios (Quadro 3), na qual apenas a Vigília do período pós-treino claro1 e o SOL do pós-treino escuro não tiveram uma correlação significativa (no caso do SOL, houve um coeficiente de correlação negativo). A maior variação nas análises de correlação intraclasse dos parâmetros gerais do sono ocorreu na Duração Média de Episódios (Quadro 4). Neste parâmetro, o estágio Vigília não obteve correlação significativa em nenhum período; o estágio SOL não obteve correlação significativa no pós-treino claro1. A correlação do ST não foi significativa no período Basal claro e no pós-treino escuro. O estágio SP não apresentou correlação significativa nos períodos Basal escuro e pós-treino claro1.

**Quadro 4:** Coeficientes de Correlação Intraclasse das Durações Médias dos estágios por período.

		Medias (min.)		Coeficiente de Correlação Intraclasse	valor-p
		10s	30s		
Basal Escuro	Vigília	1.42	4.43	0.464	0.124
	SOL	0.82	2.04	0.688	0.030 *
	ST	0.31	0.56	-0.481	0.886
	SP	0.91	1.40	0.067	0.437
Basal Claro	Vigília	1.46	4.54	0.493	0.107
	SOL	0.78	2.13	0.666	0.036 *
	ST	0.28	0.56	-0.14	0.618
	SP	0.92	1.49	0.674	0.033 *
Pós-Treino Claro1	Vigília	0.78	2.10	0.51	0.098
	SOL	0.96	2.75	0.443	0.136
	ST	0.31	0.62	0.817	0.007 *
	SP	1.10	1.66	-0.141	0.630
Pós-Treino Escuro	Vigília	1.22	3.42	0.506	0.101
	SOL	1.01	2.68	0.693	0.028 *
	ST	0.27	0.57	0.307	0.230
	SP	0.99	1.60	0.83	0.005 *
Pós-Treino Claro2	Vigília	1.00	2.24	0.438	0.192
	SOL	0.89	2.30	0.795	0.029 *
	ST	0.25	0.59	0.762	0.039 *
	SP	1.11	1.53	0.748	0.044 *

Este quadro apresenta as médias da duração média de episódios (em minutos) nas leituras em 10s e 30s, respectivamente, de cada estágio em cada período; o coeficiente de correlação intraclasse e o valor-p do teste de confiabilidade (\*p<0,05).

Nas análises Sequenciais houve uma grande variação de correlações dentre as possíveis transições de estágio a outro nos períodos. Poucas sequências apresentaram correlação intraclasse significativa em todos os períodos, como a sequência SOL-ST-SP e uma de suas variações de 2 estágios ST-SP. A sequência SOL-ST somente não obteve correlação significativa no período pós-treino claro1, período de menor quantidade de correlações significativas entre as sequências possíveis. A sequência SP-SOL não foi significativa nas fases claras do pós-treino, mas foi em todos os outros períodos. A sequência de 3 estágios SOL-ST-V apresentou correlação significativa apenas no período pós-treino escuro, assim como a sequência SOL-SP. V-SOL obteve correlação significativa apenas no período basal escuro. As demais sequências (SOL-V, ST-V, ST-SOL, SP-ST, V-ST e V-SP) não apresentaram correlação significativa em nenhum período.

**Quadro 5:** Significância das Correlações do Número de Sequências por período.

Sequências	Basal escuro	Basal claro	Pós-treino claro1	Pós-treino escuro	Pós-treino claro2
SOL-ST-SP	*	*	*	*	*
SOL-ST-V				*	
SOL-SP				*	
SOL-ST	*	*		*	*
SOL-V					
ST-V					
ST-SP	*	*	*	*	*
ST-SOL					
SP-ST					
SP-SOL	*	*		*	
SP-V	*	*		*	
V-SOL	*				
V-ST					
V-SP					

Esquema baseado nos quadros 1 a 5, em anexo, mostrando todos os períodos em que as sequências estudadas tem correlação significativa ( $p < 0,05$ ).

## **1.2 Discussão**

Uma quantidade total de 3.024.000 épocas foram lidas em 10s e 1.008.000 em 30s, equivalente a 840 horas de registro eletroencefalográfico e eletromiográfico, oriundas de sete animais.

Benington et al. (1994) afirmam que a leitura de épocas curtas de SP resultaria numa diferença significativa no tempo total deste e o número de ciclos, pois segundo eles mesmos, independente da duração do episódio de SP, este é precedido de SWS e ST. Entretanto, no presente estudo SP apresentou correlação significativa no número de episódios e no tempo total, em todos os períodos. Não obstante, o SP também apresentou uma significativa correlação da porcentagem de concordância (relativa a 30s) entre as leituras de 10s e 30s através dos períodos (Figura 6 e Quadros 2 e 3).

Porém, as afirmações do autor concordam com as diferenças observadas na duração média de episódios. A baixa correlação da duração dos episódios pode estar associada ao maior número de episódios de SP discriminados nas leituras em 10s que, apesar de mostrar uma correlação significativa, as médias aproximam-se de uma proporção de 2:1 nas leituras em 10s e 30s, respectivamente (ver Quadros 2 e 4). Por outro lado, a discriminação de pequenos despertares, com duração <10s, ou qualquer outras interrupções breves durante um episódio de SP pode ter ocorrido nas leituras em 10s separando, por exemplo, em 2 o episódio que, nas leituras de 30s seria contabilizado como apenas 1.

Sabe-se, também, uma situação de rebote por privação de sono paradoxal aumenta maciçamente o rebote de SP (Machado et al., 2004; ver tabela 3). E que tarefas de aprendizagem e memória também alteram a arquitetura do sono (Moreira et al., 2007; Mandile et al., 2000; Hellman e Abel, 2007). Apesar de não ser o objetivo deste trabalho o estudo dos efeitos de nenhuma destas manipulações experimentais (esses dados comporão um estudo maior do qual este é parte), pode-se levantar a hipótese de a baixa correlação da duração média ser devido às alterações de ambas as manipulações (ou uma delas dependendo do grupo). Nesse sentido a baixa correlação das leituras pode estar associada a uma maior

discriminação de número e duração dos episódios de SP nas leituras em épocas de 10s quando comparada às leituras em épocas de 30s.

Sabe-se que o ST tem uma duração muito pequena (máximo aproximado de 30 segundos) e é fisiologicamente similar ao sono SP ( $\delta/\theta$  e EMG baixos; Datta et al., 2000). Por isso, é constantemente não considerado como um estágio de sono a parte, e classificado como SP nas leituras de registro de ratos (Fogel et al., 2009; Mölle et al., 2009; Stephenson et al., 2009; Crisler et al., 2008; Bassi et al., 2009). Além disso, estudos feitos com comparações de leituras por diferentes experimentadores, e entre experimentadores e softwares com algoritmos para leitura automática, apresentaram uma baixa correlação para o ST (Gross et al., 2009).

Apesar de haver uma correlação significativa no Número de Episódios e no Tempo Total, esta foi baixa na Duração Média de Episódios em quase todos os períodos, e na correlação da porcentagem de concordância relativa (Figura 4). A curta duração de ST pode ter sido um fator de influência na baixa correlação tanto da concordância relativa a 30s quanto da duração média de episódios, pois, um estágio que tem duração máxima de 30 segundos lido em épocas de 30s tem uma probabilidade muito grande de ser subestimado (considerando que uma duração máxima de 30s de ST é uma ocorrência rara; ver Quadro 4).

Um dos objetivos desta comparação foi exatamente verificar a possibilidade de um estagiamento satisfatório de ST nos registros de sono, pois evidências crescentes vem apresentando relações entre características muito presentes no ST (fusos, spindles, presentes em bandas de frequência 12-15Hz) e processos de aprendizagem e memória (Molle et al., 2009; Eschenko et al., 2006; Fogel et al., 2002; Gais et al., 2002; Molle et al., 2002; Clemens et al., 2005; Meier-Koll et al., 1999; Steriade and Timofeev, 2003; Rosanova and Ulrich, 2005 ). E da própria presença do estágio em si, após SOL na retenção de tarefas de esquiva inibitória (Mandile, 2000). Apesar de não haver muitos estudos que usam o ST como um estágio do sono, por parte da literatura que estuda essas relações, ele parece ter um campo promissor tanto na literatura de estudo dessas características quanto como um estágio de sono em si (Morrisey et al., 2005).

Os estágios Vigília e SOL apresentaram uma mudança na correlação do número de episódios do período basal para o pós-treino, sendo que no pós-treino esta foi baixa para ambos. Sob privação de SP, os ratos apresentam um rebote maciço de SP em detrimento do SOL, além de uma diminuição da quantidade de V (Machado et al., 2004). A baixa correlação do número de episódios e essa diminuição do tempo total de SOL e V, podem sugerir uma modificação na arquitetura do sono, no que tange à duração e frequência dos episódios (ver Quadro 2 a 4). Um exemplo possível a ocorrência de curtos despertares, com duração <1 minuto (o que inclui arousals, episódios <10s de V) intercalados com os episódios de SOL, não discriminados pela leitura em 30s.

Apesar da pequena quantidade de correlações significativas na Duração Média, observa-se um crescente aumento destas, do pós-treino claro1 para o pós-treino claro2. Este aumento pode estar relacionado às modificações ocorridas no rebote, pois um processo lento de normalização do sono pode ter se inicializado e aumentado ao longo das 24 horas, à medida que o prejuízo do sono é suprido (Machado et al., 2004). Isso corrobora com os resultados no sentido não só da duração média, mas também as correlações das sequências e número de episódios apresentarem os menores valores de correlação nas primeiras horas de registro pós-treino, e um gradual aumento nos períodos que se seguem.

As correlações dos tempos totais foram significativas, com poucas exceções. Isso sugere que o tempo total de cada estágio não é significativamente alterado em cada leitura, o que pode ser um indicativo da eficiência de ambas as épocas de leitura, ao menos neste aspecto. Apesar de a diferença entre os tempos totais de Vigília no período pós-treino claro1 ser muito grande (ver Quadro 3), isso não pode ser inferido como uma possível causa de baixa correlação, pois o estágio SOL no período pós-treino escuro obteve um coeficiente de correlação negativa, mas os tempos totais de 10s e 30s são muito próximos. A diferença do SOL pode ser efeito de uma acentuada diferença dos grupos privado e controle, não discriminados.

A única sequência que apresentou correlação significativa em todos os períodos foi SOL-ST-SP (que contém a subsequência ST-SP, também significativa). Entretanto, a outra subsequência desta, SOL-ST, não apresentou correlação no

período pós-treino claro<sup>1</sup>, possivelmente devido às alterações do sono nas primeiras horas de rebote após a privação.

Interessante também, são as correlações das sequências SP-SOL e SP-V, que só não apresentaram significância nas fases claras pós-treino. O fato de a maior quantidade de sono dos ratos, polifásicos e noturnos, se dar na fase clara (aproximadamente 65%; Hoshino, 1972), pode sugerir que essas sequências, aliadas às manipulações experimentais, podem modificar a arquitetura do sono que cabe a elas. Um outro fato que pode ser associado a essas sequências são as modificações que envolvem os estágios (SOL, V e SP) dessas sequências nos parâmetros já analisados anteriormente. As baixas correlações encontradas nos Números de Episódios de SOL e V podem ter associação com a sua sequência após o SP, o que seria um passo adiante no argumento de ocorrência de curtos episódios durante o SP (ver Quadros 5 e anexos 1 a 5).

A sequência SOL-ST-V apresentou correlação apenas no período pós-treino escuro. Analisando-se os números (Anexos 1 a 5), nota-se que a menor correlação ocorreu no pós-treino claro<sup>1</sup>, mas as diferenças nas leituras são muito grandes para se inferir alguma relação. Mandile (2000) associa a sequência SOL-ST-V como importante para a consolidação da memória quando forma um agregado junto a sequências de SOL-ST-SP. Neste experimento, a duração média de toda sequência era de 14-35 segundos (leitura em épocas de 5 segundos). Apesar de, neste projeto a duração das sequências não ter sido mensuradas, as baixas correlações encontradas em SOL-ST-V podem ser fruto tanto da disparidade de dados intergrupo quanto da ocorrência dessas sequências com episódios curtos de cada estágio.

As comparações feitas entre as sequências levanta a discussão da relação entre número de sequências e duração dos episódios que as compõem. Interessante perceber que as maiores diferenças nas médias do número de sequências está entre as sequências de baixa correlação nos determinados períodos (ver quadros em anexo).

É importante ressaltar que a análise do teste kappa como a mais importante deste estudo, pois é a análise mais refinada, época a época. O fator adicional deste estudo são os outros parâmetros (n. episódios, tempo total, duração média de episódios e sequências de estágios) que foram comparados. A maioria dos estudos que comparam leituras de EEGs utilizam apenas testes kappa e poucos fazem esta comparação para registros de 24 horas.

Entretanto, um viés do qual este estudo sofre é o pequeno número amostral. Para testes de correlação intraclasse um estudo com um número amostral maior seria aconselhável para que se tornasse de uma precisão maior.

Muitos argumentos foram apresentados envolvendo a importância de uma discriminação mais detalhada das transições entre um estágio e outro do sono. Entretanto, é necessário pensar no que significa, em termos práticos, fazer uma leitura de registro em épocas de tempo menor. Quanto menor a época, maior o número de decisões a serem tomadas e maior o tempo gasto para a leitura dos registros. Estudos usam épocas de 4-5 segundos para ter uma discriminação melhor de cada transição, tempo e duração de estágios (Trachsel et al., 1991), mas perde em tempo útil. Por isso vem crescendo a quantidade de softwares com diferentes algoritmos, técnicas e/ou modelos, embasados em diferentes conceitos teóricos, tentando encontrar uma boa correlação com a leitura de experimentadores, somente para se otimizar o tempo que é normalmente gasto numa leitura manual e, talvez, conseguir uma leitura ainda mais detalhada (Benington et al., 1994; Gross et al., 2009; Stephenson et al., 2009; Crisler et al., 2008; Bassi et al., 2009).

### **1.3 Considerações Finais**

O mencionado até o momento leva a concluir que o melhor tempo de épocas para leitura de registros não depende somente do maior nível de detalhes possível. Existe a dificuldade do tempo gasto nas leituras manuais dos registros e, quanto menor a época, maior o nível e detalhes, porém maior é o tempo gasto para esse resultado. Isso traz em discussão, também, a disponibilidade de recursos para se

desenvolver um equipamento de leitura automática que abarque os paradigmas almejados nessa leitura. É necessário lembrar, entretanto, que não são apenas as dificuldades práticas que guiam a escolha do melhor tempo de épocas, mas o próprio nível de detalhes almejado. No delineamento experimental de um estudo, isso se vê importante (talvez a conclusão mais importante deste trabalho), pois nem sempre os grandes detalhes facilitam enxergar, nos resultados, o nível de análise que se foi proposto. E é exatamente isso que deve ser avaliado. Trabalhos que mensuram tempo total das fases do sono (Machado, 2004; Outros do dpto), por exemplo, não sofrem do viés de falta de detalhes, como visto nos resultados deste trabalho. Em contrapartida, trabalhos que almejam períodos, estágios (Gross et al., 2009) ou sequências (Mandile, 2000) curtas necessitam de discriminação mais minuciosa das transições entre fases. Ou mesmo manipulações experimentais que podem alterar parâmetros de curta duração ou sequenciais tais como privação de sono, tarefas de aprendizagem e memória (Moreira et al., 2007, Mandile, 2000, Hellman e Abel, 2007) entre outros também necessitam de maior nível de detalhes se o objetivo do estudo envolve os parâmetros alterados. Assim, o delineamento experimental é um fator determinante da necessidade do detalhamento da arquitetura do sono, e o tempo hábil e/ou recursos fatores determinantes para um detalhamento otimizado entre os três fatores.

É importante destacar que este estudo é parte integrante de um estudo maior, onde se encontram os dados comportamentais e comparações estatísticas entre os grupos experimentais C e PS. Este estudo limitou-se a comparar diferentes leituras de registros eletroencefalográficos. Entretanto, durante a discussão foram levantadas as hipóteses de as baixas correlações terem sido devido à privação de SP ou à tarefa da esquiva inibitória. Este trabalho não mostra isso, apenas se baseia em estudos já realizados para levantar tais hipóteses.

## Referências Bibliográficas

1. AMBROSINI MV, LANGELLA M, GIRONI CARNEVALE UA, GIUDITTA A. **The sequential hypothesis of sleep function. III. The structure of postacquisition sleep in learning and nonlearning rats.** *Physiol Behav.* 1992 Feb;51(2):217-26.
2. ASERINSKY and KLEITMAN N. **Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep.** *Science.* 1953 Sep 4;118(3062):273-4
3. BASSI A, VIVALDI EA, OCAMPO-GARCÉS A. **The Time Course of the Probability of Transition Into and Out of REM Sleep.** *SLEEP* 2009; 32(5): 655-669.
4. BENINGTON JH, KODALIN SK and HELLER HC. **Spring Transitions to REM Sleep in Rats Based on the EEG Phenomena of Pre-REM Sleep: An Improved Analysis of Sleep Structure.** *Sleep* 1994; 17(1):28-36.
5. BERGMANN BM, KUSHIDA CA, EVERSON CA, GILLILAND MA, OBERMEYER W, RECHTSCHAFFEN A. **Sleep deprivation in the rat: II. Methodology.** *Sleep.* 1989 12(1): 5-12.
6. BUENO OFA, LOBO LL, OLIVEIRA MGM, GUGLIANO EB, POMARICO AC, TUFIK S. **Dissociated paradoxical sleep deprivation effects on inhibitory avoidance and conditioned fear.** *Physiol Behav.* 1994 Oct;56(4):775-9.
7. CLEMENS Z, FABO D, HALASZ P. **Overnight verbal memory retention correlates with the number of sleep spindles.** *Neuroscience* 2005; 132:529 –535.
8. CRICK F, MITCHISON G. **The function of dream sleep.** *Nature.* 1983 Jul 14-20;304(5922):111-4.
9. CRISLER S, MORRISSEY MJ, ANCH AM, BARNETT DW. **Sleep-stage scoring in the rat using a support vector machine.** *J Neurosc Methods* 2008; 168: 524-534.
10. DATTA S. **Avoidance task training potentiates phasic pontine-wave density in the rat: A mechanism for sleep-dependent plasticity.** *J Neurosci.* 2000 Nov 15;20(22):8607-13.
11. DUBIELA FP, de OLIVEIRA MGM, MOREIRA KD, NOBREGA JN, TUFIK S, HIPOLIDE DC. **Learning deficits induced by sleep deprivation and recovery are not associated with altered [(3)H]muscimol and [(3)H]flunitrazepam binding.** *Brain Res.* 2005 Mar 10;1037(1-2):157-63.
12. ESCHENKO O, MÖLLE M, BORN J, SARA SJ. **Elevated Sleep Spindle Density after Learning or After Retrieval in Rats.** *Journal of Neuroscience* 2006; 26(50): 12914-12920.
13. FISHBEIN W, GUTWEIN BM. **Paradoxical sleep and memory storage processes.** *Behav Biol.* 1977 Apr;19(4):425-64.
14. FOGEL S, JACOB J, SMITH C. **The role of sleep spindles in simple motor procedural learning.** *Sleep [Suppl]* 2002; 25:A279 –A280.

15. FOGEL SM, SMITH CT, BNINGER RJ. **Evidence for 2-stage models of sleep and memory: Learning-dependent changes in spindles and theta in rats.** *Brain Res Bulletin* 2009; 79: 445-451.
16. FOGEL SM., JACOB J. AND SMITH CT. **Increased sleep spindle activity following simple motor procedural learning in humans.** In: Proceedings of the Congress Physiological Basis for Sleep Medicine. 2001 7, p. 123. Actas de Fisiología
17. GAIS S, MOLLE M, HELMS K, BORN J. **Learning-dependent increases in sleep spindle density.** *J Neurosci.* 2002 Aug 1;22(15):6830-4.
18. GIUDITTA A, AMBROSINI MV, MONTAGNESE P, MANDILE P, COTUGNO M, GRASSI ZUCCONI G, VESCIA S. **The sequential hypothesis of the function of sleep.** *Behav Brain Res.* 1995 Jul-Aug;69(1-2):157-66. Review.
19. MANDILE P, VESCIA S, MONTAGNESE P, PISCOPOS, COTUGNO M, GIUDITTA A. **Post-trial sleep sequences including transition sleep are involved in avoidance learning in adult rats.** *Behavioral Brain Research* 2000; 112: 23-31
20. GOTTESMANN C, GANDOLFO G, ZERNICKI B. **Intermediate stage of sleep in the cat.** *J Physiol (Paris)* 1984; 79: 365-72.
21. GOTTESMANN C. **Detection of seven sleepwaking stages in the rat.** *Neurosci Biobehav Rev* 1992; 16: 31-8.
22. GROSS BA, WALSH CM, TURAKHIA AA, BOOTH V, MASHOUR GA, POE GR. **Open-source logic-based automated sleep scoring software using electrophysiological recordings in rats.** *J Neurosc Methods* 2009; 184: 10-18.
23. GUTWEIN BM, SHIROMANI PJ, FISHBEIN W. **Paradoxical sleep and memory: long-term disruptive effects of Anisomycin.** *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1980. 12: 377–384.
24. HEBB DO. **The Organization of Behavior.** 1949; Wiley, New York.
25. HELLMAN K, ABEL T. **Fear conditioning increases NREM.** *Sleep.Behav Neurosci.* 2007 Apr;121(2):310-23.
26. HENNEVIN E, LECONTE P. **[The function of paradoxical sleep: facts and theories]** *Annee Psychol.* 1971;71(2):489-519.
27. HOSHINO K. **Perturbações motoras agudas induzidas pela lesão eletrolítica da formação reticular mesencefálica de ratos privados de sono paradoxal.** Botucatu. 1972 (Tese de Doutorado- Universidade Estadual de São Paulo).
28. Karni A, TANNE D, RUBENSTEIN BS, ASKENASY JJ, SAGI D. **Dependence on REM sleep of overnight improvement of a perceptual skill.** *Science.* 1994 Jul 29;265(5172):679-82.
29. LOUIE, K AND WILSON, MA. **Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep.** *Neuron* 2001 29: 145–156.
30. MACHADO RB, HIPOLIDE DC, BENEDITO-SILVA AA, TUFIK S. **Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery.** *Brain Res.* 2004 Apr 9;1004(1-2):45-51.

31. MADSEN PL, VORSTRUP S. **Cerebral blood flow and metabolism during sleep.** Cerebrovasc Brain Metab Rev. 1991 Winter;3(4):281-96. Review.
32. MAQUET P, LAUREYS S, PEIGNEUX P, FUCHS S, PETIAU C, PHILLIPS C, AERTS J, DEL FIORE G, DEGUELDRE C, MEULEMANS T, LUXEN A, FRANCK G, VAN DER LINDEN M, SMITH C, CLEEREMANS A. **Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep.** Nat Neurosci. 2000 Aug;3(8):831-6.
33. MAQUET P, PEIGNEUX P, LAUREYS S, BOLY M, DANG-VU T, DESSEILLES M, CLEEREMANS A. **Memory processing during human sleep as assessed by functional neuroimaging.** Rev Neurol (Paris). 2003 Nov;159(11 Suppl):6S27-9. Review.
34. MCCARLEY RW, HOBSON JA. **Cortical unit activity in desynchronized sleep.** Science 1970; 167: 901-3.
35. MEIER-KOLL A, BUSSMANN B, SCHMIDT C, NEUSCHWANDER D. **Walking through a maze alters the architecture of sleep.** Percept Mot Skills 1999; 88:1141–1159.
36. MÖLLE M, ESCHENKO O, GAIS S, SARA SJ E BORN J. **The Influence of Learning on Sleep Slow Oscillations and Associated Spindles and Ripples in Humans and Rats.** Euro J Neurosc 2009; 29:1071-1081.
37. MOLLE M, MARSHALL L, GAIS S, BORN J. **Grouping of spindle activity during slow oscillations in human non-rapid eye movement sleep.** J Neurosci 2002; 22:10941–10947.
38. MOREIRA KM, HIPOLIDE DC, TIBA PA, TUFIK S, OLIVEIRA MGM. **Relationship between sleep parameters and inhibitory avoidance performance in sleep deprived rats.** Program no. 639.16. 2007 neuroscience meeting planner. San diego, ca: society for neuroscience, 2007. Online.
39. MOREIRA KM, HIPOLIDE DC, NOBREGA JN, BUENO OFA, TUFIK S, OLIVEIRA MGM. **Deficits in avoidance responding after paradoxical sleep deprivation are not associated with altered [3H]pirenzepine binding to M1 muscarinic receptors in rat brain.** Brain Res. 2003 Jul 4;977(1):31-7.
40. MORRISSEY MJ, ANCH AM, DUNTLEY SP. **An evaluation of the use of seizure prone rats when investigating intermediate stage sleep.** J Neurosc Methods 2005; 143: 159-162.
41. PAVLIDES C AND WINSON J. **Influences of hippocampal place cell firing in the awake state on the activity of these cells during subsequent sleep episodes.** J. Neurosci. 1989. 9: 2907–2918.
42. RIBEIRO S, GOYAL V, MELLO CV, AND PAVLIDES C. **Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience.** Learn. Mem. 1999 6: 500–508.
43. ROBERTSON EM. **Skill learning: putting procedural consolidation in context.** Curr Biol. 2004 Dec 29;14(24):R1061-3. Review.
44. ROSANOVA M, ULRICH D. **Pattern-specific associative long-term potentiation induced by a sleep spindle-related spike train.** J Neurosci 2005; 25:9398 –9405.

45. RUIGT GSF, VAN PROOSDIJ JN, VAN DELFT AML. **A large scale, high resolution, automated system for rat sleep staging.** I. Methodology and Technical aspects. *Eletroencephalogr Clin Neurophysiol* 1989; 73: 52-63.
46. SANFORD LD, SILVESTRI AJ, ROSS RJ, MORRISON AR. **Influence of fear conditioning on elicited ponto-geniculo-occipital waves and rapid eye movement sleep.** *Arch Ital Biol.* 2001 Apr;139(3):169-83.
47. SILBER MH, ANCOLI-ISRAEL S, BONNET MH, CHOKROVERTY S, GRIGG-DAMBERGER MM, HIRSHKOWITZ M, KAPEN S, KEENAN SA, KRYGER MH, PENZEL T, PRESSMAN MR, IBER C. **The Visual Scoring of Sleep in Adults.** *J Clin Sleep Med* 2007; 3(2): 121-131.
48. SKAGGS WE AND MCNAUGHTON BL. **Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experience.** *Science.* 1996 271: 1870–1873.
49. SMITH C. **Sleep states and memory processes.** *Behav Brain Res.* 1995 Jul-Aug;69(1-2):137-45. Review.
50. SMITH CT, CONWAY JM, ROSE GM. **Brief paradoxical sleep deprivation impairs reference, but not working, memory in the radial arm maze task.** *Neurobiol Learn Mem.* 1998 Mar;69(2):211-7.
51. SMITH CT, NIXON MR, NADER RS. **Posttraining increases in REM sleep intensity implicate REM sleep in memory processing and provide a biological marker of learning potential.** *Learn Mem.* 2004 Nov-Dec;11(6):714-9.
52. STEPHENSON R, CARON AM, CASSEL CB, KOSTELA JC. **Automated analysis of sleep-wake state in rats.** *J Neurosc Methods* 2009; 184: 263-274.
53. STERIADE M, TIMOFEEV I. **Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations.** *Neuron* 2003; 37:563–576.
54. STICKGOLD R, JAMES L, HOBSON JA. **Visual discrimination learning requires sleep after training.** *Nat Neurosci.* 2000 Dec;3(12):1237-8.
55. SUCHECKI D, TUFIK S. **Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat.** *Physiol Behav* 2000 68(3): 309-16.
56. TIMO-IARIA C, NEGRAO N, SCHMIDEK WR, HOSHINO K, LOBATO DE MENEZES CE, LEME DA ROCHA T. **Phases and states of sleep in the rat.** *Physiol Behav.* 1970 Sep;5(9):1057-62.
57. TIMO-IARIA C, YAMASHITA R, HOSHINO K, SOUZA-MELO A. **Rostrum movements in desynchronized sleep as a prevalent manifestation of dreaming activity in Wistar rats.** *Braz J Med Biol Res.* 1990;23(6-7):617-20.
58. TRACHSEL L, TOBLER I, ACHERMANN P, BORBELY AA. **Sleep continuity and REM-nonREM cycle in the rat under baseline conditions and after sleep deprivation.** *Physiol Behav* 1991; 49:575-80.

59. TRACHSEL L, TOBLER I, BOBERLY AA. **Electroencephalogram analysis of nonrapid eye movement sleep in rats.** *Am J Physiol* 1988; 255: R27-R37.
60. VAN TWYVER H. **Sleep patterns in five rodent species.** *Physiol Behav* 1969; 4:901-5.
61. WALKER MP, BRAKEFIELD T, MORGAN A, HOBSON JA, STICKGOLD R. **Practice with sleep makes perfect: sleep-dependent motor skill learning.** *Neuron.* 2002 Jul 3;35(1):205-11.
62. WALKER MP, BRAKEFIELD T, MORGAN A, HOBSON JA, STICKGOLD R. **Practice with sleep makes perfect: sleep-dependent motor skill learning.** *Neuron.* 2002 Jul 3;35(1):205-11.
63. WALKER MP, STICKGOLD R. **Sleep-dependent learning and memory consolidation.** *Neuron.* 2004 Sep 30;44(1):121-33. Review.
64. WEISS T, ROLDAN E. **Comparative study of sleep cycles in rodents.** *Experientia* 1964; 20:280-1.
65. WINSON J. **Brain and psyche.** 1985, Anchor Press, New York.

## ANEXOS

**Quadro Anexo1:** Coeficientes de Correlação do Número de Sequências no período Basal Escuro ( $p \leq 0,05$ )

Sequências	Médias		Coeficiente de Correlação Intraclasse	valor-p	
	10s	30s			
SOL-ST-SP	27.86	18.57	0.861	0.003	*
SOL-ST-V	32.86	9.86	0.532	0.087	
SOL-SP	3.29	8.57	0.485	0.111	
SOL-ST	82.57	34.29	0.719	0.022	*
SOL-V	197.71	64.71	0.440	0.138	
ST-V	35.86	10.57	0.445	0.135	
ST-SP	32.43	21.29	0.963	0.000	*
ST-SOL	22.86	5.57	0.190	0.326	
SP-ST	2.29	1.71	-0.067	0.562	
SP-SOL	3.14	6.29	0.769	0.013	*
SP-V	43.43	24.00	0.950	0.000	*
V-SOL	254.43	95.43	0.720	0.022	*
V-ST	7.00	2.00	0.213	0.307	
V-SP	13.14	2.71	0.503	0.102	

**Quadro Anexo2:** Coeficientes de Correlação do Número de Sequências no período Basal Claro ( $p \leq 0,05$ )

Sequências	Médias		Coeficiente de Correlação Intraclasse	valor-p	
	10s	30s			
SOL-ST-SP	28.86	17.29	0.883	0.002	*
SOL-ST-V	21.00	6.86	0.412	0.155	
SOL-SP	2.71	8.43	0.467	0.122	
SOL-ST	66.43	28.29	0.668	0.035	*
SOL-V	173.29	68.14	0.536	0.086	
ST-V	23.43	7.43	0.455	0.129	
ST-SP	33.86	18.86	0.842	0.004	*
ST-SOL	16.29	4.43	0.377	0.178	
SP-ST	2.29	1.43	0.530	0.088	
SP-SOL	2.43	7.43	0.799	0.009	*
SP-V	43.43	20.57	0.707	0.025	*
V-SOL	217.14	93.00	0.605	0.056	
V-ST	5.43	1.00	0.423	0.148	
V-SP	12.00	2.00	0.245	0.279	

**Quadro Anexo3:** Coeficientes de Correlação do Número de Sequências no período pós-treino Claro1 ( $p \leq 0,05$ )

Sequências	Médias		Coeficiente de Correlação Intraclasse	valor-p	
	10s	30s			
SOL-ST-SP	29.29	19.00	0.682	0.031	*
SOL-ST-V	4.86	0.43	0.051	0.453	
SOL-SP	3.71	2.00	0.018	0.483	
SOL-ST	45.29	23.71	0.502	0.103	
SOL-V	67.29	13.14	-0.024	0.523	
ST-V	8.86	1.43	-0.155	0.643	
ST-SP	48.14	27.86	0.781	0.011	*
ST-SOL	12.57	6.00	0.154	0.360	
SP-ST	18.29	11.29	0.520	0.093	
SP-SOL	10.57	8.86	0.302	0.234	
SP-V	30.43	10.29	0.540	0.084	
V-SOL	90.57	21.71	-0.029	0.528	
V-ST	6.29	1.00	-0.116	0.608	
V-SP	9.86	2.00	0.336	0.208	

**Quadro Anexo 4:** Coeficientes de Correlação do Número de Sequências no período pós-treino Escuro ( $p \leq 0,05$ )

	Médias		Coeficiente de Correlação Intraclasse	Valor-p	
	10s	30s			
SOL-ST-SP	32.43	24.57	0.938	0.000	*
SOL-ST-V	16.29	4.71	0.638	0.044	*
SOL-SP	4.71	3.29	0.752	0.016	*
SOL-ST	66.29	34.57	0.798	0.009	*
SOL-V	127.57	33.29	0.308	0.229	
ST-V	21.14	5.43	0.522	0.092	
ST-SP	45.14	30.43	0.924	0.001	*
ST-SOL	19.00	5.57	0.507	0.100	
SP-ST	7.00	5.71	0.465	0.123	
SP-SOL	6.57	8.14	0.812	0.007	*
SP-V	46.14	19.43	0.797	0.009	*
V-SOL	167.29	54.43	0.590	0.062	
V-ST	11.29	1.00	0.110	0.397	
V-SP	12.00	2.14	0.437	0.139	

**Quadro Anexo5:** Coeficientes de Correlação do Número de Sequências no período pós-treino Claro2 ( $p \leq 0,05$ )

Sequências	Médias		Coeficiente de Correlação Intraclasse	valor-p	
	10s	30s			
SOL-ST-SP	16.20	13.00	0.779	0.034	*
SOL-ST-V	11.80	3.40	0.597	0.105	
SOL-SP	1.40	2.60	0.146	0.391	
SOL-ST	33.60	20.60	0.900	0.007	*
SOL-V	89.80	24.40	0.529	0.140	
ST-V	13.60	4.20	0.592	0.108	
ST-SP	19.40	14.60	0.853	0.015	*
ST-SOL	5.40	4.60	0.706	0.058	
SP-ST	0.20	2.80	-0.080	0.560	
SP-SOL	1.60	3.60	-0.522	0.856	
SP-V	23.60	10.60	0.670	0.073	
V-SOL	113.00	37.60	0.618	0.095	
V-ST	5.80	1.00	0.309	0.276	
V-SP	5.60	1.40	0.644	0.084	