

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI PSICOLOGIA GENERALE

Corso di Laurea Triennale in Scienze Psicologiche Cognitive e Psicobiologiche

Elaborato Finale

**Targeted Memory Reactivation in closed-loop:
effetti della stimolazione acustica durante il sonno
sui correlati EEG**

*Targeted Memory Reactivation in closed-loop: effects of acoustic stimulation during sleep on
EEG correlates*

Relatore: Prof. Nicola Cellini

Correlatrice: Dott.ssa Damiana Bergamo

Laureando: Matteo Carasi

Matricola: 2074185

Anno Accademico 2024-2025

Indice

INTRODUZIONE	1
1 IL SONNO	2
1.1 Definizione e funzioni del sonno	2
1.2 Architettura del sonno	3
1.2.1 Onde nel sonno NREM	5
2 SONNO E MEMORIA	8
2.1 Il ruolo del sonno sul consolidamento mnestico	8
2.2 Ipotesi del consolidamento di sistema attivo	9
2.2.1 Accoppiamento dei ritmi del sonno: <i>SO-spindles-ripples</i>	10
2.3 Memoria e stimolazione sensoriale del sonno a onde lente	11
2.3.1 TMR (<i>Targeted Memory Reactivation</i>)	12
2.3.2 CLAS (<i>Closed-loop Auditory Stimulation</i>)	13
2.3.3 CL-TMR (<i>Closed-loop Targeted Memory Reactivation</i>)	15
3 LA RICERCA	17
3.1 Introduzione	17
3.2 Materiali e Metodi	18
3.2.1 Partecipanti	18
3.2.2 Compito sperimentale	19
3.2.3 Procedura Sperimentale	20
3.2.4 Registrazione EEG	21
3.2.5 Protocollo di stimolazione CL-TMR	22
3.2.6 Pre-processamento del segnale EEG	23
3.2.7 Analisi EEG	24
3.3 Risultati	25
3.3.1 Caratteristiche demografiche	25
3.3.2 Potenziali Evento-Relati Uditivi	25
3.4 Discussione e Conclusioni	27
Bibliografia	32

INTRODUZIONE

Le onde lente, caratteristiche del sonno NREM, costituiscono un meccanismo centrale nell'orchestrare i processi neurofisiologici responsabili del consolidamento mnestico durante il sonno. Negli ultimi anni, l'attenzione si è progressivamente orientata verso la possibilità di influenzare in modo non invasivo tali oscillazioni attraverso la stimolazione sensoriale. L'obiettivo del presente elaborato è esplorare i più recenti paradigmi di stimolazione acustica, ponendo particolare attenzione ai correlati elettrofisiologici modulati da tali stimolazioni.

Nel primo capitolo verrà definito il sonno come fenomeno e introdotte brevemente alcune delle ipotesi relative alle sue funzioni. Sarà poi approfondita la sua architettura, con particolare attenzione al sonno a onde lente e agli eventi elettrofisiologici che lo contraddistinguono.

Il secondo capitolo affronterà il ruolo del sonno nel consolidamento mnestico e, con riferimento alla teoria del consolidamento di sistema attivo, verrà analizzato l'accoppiamento tra le oscillazioni tipiche del sonno a onde lente e il loro ruolo nel promuovere il rafforzamento e la riorganizzazione dei ricordi appresi durante la veglia. Nella seconda parte del capitolo verranno discussi alcuni dei paradigmi di stimolazione non invasiva impiegati negli ultimi due decenni per modulare il sonno a onde lente.

Infine, il terzo capitolo descriverà la ricerca condotta per indagare l'effetto della stimolazione acustica, applicata secondo il paradigma CL-TMR (*Closed-loop Targeted Memory Reactivation*), sui correlati elettrofisiologici.

CAPITOLO 1

IL SONNO

1.1 Definizione e funzioni del sonno

Per lungo tempo il sonno è stato largamente interpretato come uno stato passivo e omogeneo, caratterizzato dalla semplice sospensione delle attività tipiche della veglia (Kryger et al., 2017). Tuttavia, nel secolo scorso, questa visione fu ampiamente modificata, soprattutto in seguito a due scoperte fondamentali: l'invenzione dell'elettroencefalografia (EEG) da parte di Hans Berger nel 1928, che permise per la prima volta di rilevare i cambiamenti che occorrono nell'attività elettrica cerebrale tra la veglia e il sonno, e la successiva scoperta del sonno REM (*Rapid Eye Movement*) da parte di Aserinsky e Kleitman nel 1953, che invece rese possibile osservare come, durante il sonno, si possano registrare dei livelli di attività elettrica talvolta paragonabili a quelli della veglia (Kryger et al., 2017).

Grazie ai crescenti progressi nei metodi di ricerca e nelle tecnologie impiegate, il sonno è oggi inteso non più come semplice stato di inattività, ma come uno stato fisiologico e comportamentale complesso, nel quale, nonostante si registri una complessiva riduzione delle soglie sensoriali, risulta possibile ricevere ed elaborare informazioni provenienti dall'ambiente circostante (Andrillon & Kouider, 2020; Ficca & Fabbri, 2019).

Alla luce di queste evidenze, Fagioli & Salzarulo (1995) ridefinirono il sonno come "uno stato dell'organismo caratterizzato da una ridotta reattività agli stimoli ambientali che comporta la sospensione dell'attività relazionale (rapporti con l'ambiente) e modificazioni della coscienza; esso si instaura spontaneamente e periodicamente, si autolimita nel tempo ed è reversibile".

L'alternanza ciclica tra veglia e sonno, descritta opportunamente nella definizione come fenomeno spontaneo e periodico, viene meglio concettualizzata dal modello a due processi di Borbély (1982; 2016) come il risultato dell'interazione continua di due meccanismi regolativi: il processo C (*circadian*) e il processo S (*sleep*). Il primo funge da *pacemaker* biologico endogeno, risponde ai segnali ambientali (luce) attraverso il nucleo soprachiasmatico (SCN) dell'ipotalamo e determina i livelli di vigilanza durante il giorno. Il processo S, invece, rappresenta la crescente pressione al sonno che si accumula in seguito ad un periodo prolungato di veglia. La propensione all'addormentamento, secondo questo modello, emerge dunque dall'interazione tra la fase del ritmo circadiano (processo C) e la pressione al sonno (processo S).

Pur essendoci un certo consenso sulla definizione di sonno, le sue funzioni restano in parte sconosciute e sono oggetto di diverse ipotesi interpretative. Tra queste, una delle più note è la cosiddetta ipotesi nulla (*null hypothesis*), secondo la quale il sonno non avrebbe una funzione specifica, ma rappresenterebbe semplicemente una forma di "inattività adattiva",

modellata in risposta ai vincoli ecologici specifici di ogni specie. In questo contesto, l'enorme variabilità osservata nelle abitudini di sonno, sia intraspecifica che interspecifica, troverebbe una spiegazione nel diverso vantaggio ecologico che ogni specie, ed ogni individuo al suo interno, ottiene dal dormire in relazione alle specifiche pressioni ambientali a cui è sottoposto (Siegel, 2009).

Nonostante questa teoria, secondo Cirelli & Tononi (2008), sono tre le evidenze che confutano l'ipotesi nulla, suggerendo che il sonno svolga, al contrario, una funzione essenziale e specifica. In primo luogo la presenza di sonno è stata riscontrata in tutte le specie osservate fino ad ora, sebbene con enormi differenze sia in termini quantitativi che qualitativi. In secondo luogo, il sonno sembra essere regolato omeostaticamente in tutte le specie, il che implica che una perdita di sonno venga sempre seguita da un *rebound* compensatorio, che può manifestarsi sia con un aumento della durata del sonno che con una modifica strutturale dell'episodio di sonno successivo. Infine, a sostegno dell'idea che il sonno ricopra un ruolo fondamentale, vi è l'evidenza che la privazione di sonno produca conseguenze negative, in particolare in termini di intrusioni di sonno e di decadimento cognitivo. Un esempio particolarmente significativo di tale teoria è stato osservato in uno studio condotto sui ratti, i quali, privati del sonno, hanno subito un incremento del tasso metabolico ed una perdita di peso che li ha portati alla morte dopo 2-4 settimane (Rechtschaffen & Bergmann, 2002).

Secondo le teorie funzionaliste, il sonno sarebbe dunque responsabile di diverse funzioni, tra cui la conservazione dell'energia, la riparazione dei tessuti cellulari, la regolazione metabolica, il controllo delle funzioni immunitarie, la plasticità sinaptica e il consolidamento della memoria (Rasch & Born, 2013).

1.2 Architettura del sonno

Con il termine "architettura del sonno" ci si riferisce alla struttura e all'organizzazione temporale dei diversi stadi comportamentali e fisiologici che caratterizzano il sonno.

Questa struttura può essere studiata e misurata attraverso la polisonnografia (PSG), una tecnica che consente la registrazione simultanea di vari indici fisiologici, tra cui l'EEG, l'elettromiogramma (EMG) e l'elettrooculogramma (EOG). Questi strumenti permettono di identificare le diverse fasi del sonno e di analizzare i pattern di attività cerebrale, muscolare e oculare, che le caratterizzano. In particolare, l'EEG consente di distinguere diverse bande di frequenza associate ai vari ritmi cerebrali: beta (16-35 Hz), sigma (12-16 Hz), alfa (8-12 Hz), theta (4-8 Hz) e delta (0.5-4 Hz) (Ficca & Fabbri, 2019).

Durante la veglia attiva, l'EEG evidenzia principalmente attività beta, caratterizzata da elevata frequenza e bassa ampiezza, la quale riflette un'attività corticale desincronizzata, tipica dei processi cognitivi, motori e percettivi. Quando il soggetto si trova in uno stato di veglia

rilassata, invece, prevale il ritmo alfa. Infine, durante il sonno NREM (dall'inglese *Non-Rapid Eye Movement*), si osserva un progressivo aumento dell'ampiezza e una concomitante diminuzione della frequenza delle onde, segno di una crescente sincronizzazione dell'attività dei neuroni piramidali corticali (Fuller et al., 2006).

Il sonno è un fenomeno organizzato secondo una gerarchia ben definita, articolata su più livelli. Il primo riguarda la successione tra veglia e sonno, che dà origine all' "episodio di sonno". A un livello successivo si colloca l'alternanza ciclica tra sonno NREM e sonno REM (*Rapid Eye Movement*), che insieme costituiscono il cosiddetto "ciclo del sonno", ripetuto più volte durante la notte. All'interno del sonno NREM si distinguono tre sottostadi, N1, N2 e N3, ciascuno caratterizzato da specifici parametri fisiologici. Ogni stadio comprende anche eventi fasici distintivi, come i movimenti oculari rapidi tipici del sonno REM o i complessi K che caratterizzano alcune fasi del sonno NREM (Ficca & Fabbri, 2019).

Il primo livello riguarda sia l'interazione tra sonno e veglia, regolata dal modello a due processi proposto da Borbély (1982) e descritto nel capitolo precedente, sia le dinamiche tipiche dell'addormentamento e del risveglio, nonché l'andamento del sonno durante l'intera notte.

Successivamente, il sonno viene suddiviso in due stadi con funzioni indipendenti: il sonno NREM e il sonno REM, il cui alternarsi costituisce il "ciclo di sonno". Un adulto sano compie in media da 4 a 6 cicli per notte, ciascuno della durata media di 90-110 minuti. Nel corso della notte si osserva un'inversione nella composizione dei cicli: i primi cicli sono più ricchi di sonno NREM, in particolare di sonno a onde lente (*Slow Wave Sleep*, SWS), mentre gli ultimi cicli presentano una maggiore quantità di sonno REM (Chokroverty, 2010). Nonostante le proporzioni dei singoli stadi varino da notte a notte e anche all'interno dello stesso episodio di sonno, l'organizzazione in cicli NREM-REM viene sempre mantenuta (Feinberg et al., 1980). Laddove essa venga interrotta si osservano infatti disturbi del sonno: un caso è quello dei pazienti che soffrono di narcolessia, i quali, invece di addormentarsi nella fase NREM, iniziano il loro sonno direttamente in REM (Colten & Altevogt, 2006).

Il sonno NREM è successivamente organizzato in una sequenza di sottostadi che riflettono un progressivo rallentamento dell'attività corticale e la comparsa di grafoelementi specifici. L'attuale classificazione dell'*American Association of Sleep Medicine* (AASM; Iber, 2007) distingue 3 stadi, denominati N1, N2 ed N3, mentre il manuale di Rechtschaffen & Kales (1968) ne prevedeva 4.

Lo stadio N1 rappresenta lo stadio di sonno più leggero, tipico della fase di addormentamento, durante il quale risulta molto facile risvegliarsi. Durante il primo ciclo di sonno notturno, la sua durata media varia tra 1 e 7 minuti e, complessivamente, costituisce solo il 2,5-5% dell'intero episodio di sonno. Nei soggetti sani che presentano attività alfa durante la veglia rilassata, la transizione a N1 è segnata dalla riduzione di tale ritmo, accompagnata da un incremento dell'attività theta e dalla comparsa di movimenti oculari lenti (*Slow Eye Movements*,

SEMs).

Lo stadio N2 si contraddistingue per un aumento ulteriore di attività theta, presente per almeno il 50% dell'epoca, nonché per la comparsa di due grafoelementi distintivi: i complessi K e i fusi del sonno (*sleep spindles*), che verranno approfonditi nel paragrafo 1.2.1. In individui sani, lo stadio N2 può arrivare a costituire circa il 50% della durata totale del sonno. In questa fase si osservano una riduzione dei movimenti oculari lenti e del tono muscolare, mentre la probabilità di risveglio risulta significativamente diminuita.

Il sonno N3, noto anche come sonno ad onde lente (SWS), è contraddistinto da una progressiva sincronizzazione del tracciato EEG, con onde a bassa frequenza (< 4 Hz) ed elevata ampiezza (> 75 μ V). Le onde lente comprendono sia le oscillazioni lente (< 1 Hz) sia le onde delta (1-4 Hz). L'attività nella banda delta deve occupare almeno il 20% dell'epoca per consentire l'identificazione di questo stadio. Il sonno a onde lente rappresenta circa il 20-25% della durata complessiva di un episodio di sonno e, poiché è regolato su base omeostatica, la sua distribuzione temporale è maggiormente concentrata nella prima parte della notte, per poi diminuire progressivamente nella seconda parte. Questo calo è legato alla riduzione della "pressione del sonno", che si attenua man mano che il sonno prosegue (Borbély, 1982).

Il sonno REM, chiamato anche "sonno paradossale" da Aserinsky e Kleitman nel 1953, si caratterizza per un'attività EEG desincronizzata, con onde a basso voltaggio e frequenze miste: sono presenti infatti intrusioni di attività alfa e beta in un contesto di onde delta. Tra gli eventi tonici che contraddistinguono questa fase troviamo, oltre alla desincronizzazione dell'EEG, una marcata riduzione del tono muscolare (atonia muscolare). Tra gli eventi fascici tipici del sonno REM si osservano invece i movimenti oculari rapidi (REMs), un'attivazione motoria improvvisa (mioclonie) e le caratteristiche "sawtooth waves" (letteralmente, "onde a dente di sega" per la loro forma molto definita). Durante il sonno REM si registra anche un elevato consumo metabolico, accompagnato da una disregolazione della respirazione, della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa, oltre ad assenza di termoregolazione. Il sonno REM rappresenta circa il 20% di un ciclo completo di sonno. A differenza del sonno NREM, la presenza del sonno REM è regolata dal ritmo circadiano, il che significa che la sua presenza dipende dal momento della giornata (Ficca & Fabbri, 2019; Carskadon & Dement, 2005).

1.2.1 Onde nel sonno NREM

Il sonno NREM è caratterizzato da specifici grafoelementi: le oscillazioni lente (*slow oscillations*), i fusi del sonno (*sleep spindles*), i complessi K (*K-complexes*) e gli *sharp-wave ripples*.

Le oscillazioni lente (SOs) rappresentano fluttuazioni dell'eccitabilità corticale, con una frequenza di circa 0,75 Hz, che riflette un'alternanza ritmica tra *up-state* depolarizzanti e *down-*

state iperpolarizzanti. Sebbene possano talvolta manifestarsi in modo isolato, le SOs tendono a comportarsi come *travelling waves*, originando nei siti corticali prefrontali e propagandosi verso le rimanenti aree della corteccia, il talamo e l'ippocampo (Klinzing et al., 2019; Staresina, 2024). Una delle principali funzioni delle oscillazioni lente è quella di sincronizzare l'attività di ampie popolazioni neuronali durante il passaggio da *down-state* ad *up-state*, coordinando così l'attività degli *sleep spindles* e degli *sharp-wave-ripples*. In questo modo, le SOs supportano i processi di consolidamento e riorganizzazione della memoria che avvengono durante il sonno (Diekelmann & Born, 2010).

Gli *sleep spindles* sono oscillazioni transitorie, di ampiezza variabile, con frequenza compresa tra i 12 e i 16 Hz e una durata di 0,5-2 secondi. Vengono generati dai neuroni reticolari del talamo e talamocorticali e trasmessi verso la corteccia e l'ippocampo. Gli *spindles* sono onde distintive sia dello stadio N2 che dello stadio N3 del sonno NREM; tuttavia, in quest'ultimo stadio sembrano prevalere gli *spindles* più lenti (8-12 Hz) (Staresina, 2024). Secondo Staresina et al. (2015), gli *spindles* veloci, a differenza di quelli lenti, tendono a verificarsi nell'*up-state* delle SOs e, di conseguenza, sembrano avere un ruolo privilegiato nell'interazione tra SOs e *spindles* a livello ippocampale. La presenza degli *spindles* aumenta durante il sonno successivo all'apprendimento, soprattutto nelle aree corticali coinvolte maggiormente durante il processo di codifica; inoltre, la densità degli stessi *spindles* correla con la performance di recupero del contenuto mnestico dopo il sonno (Klinzing et al., 2019).

I complessi K, insieme agli *spindles*, costituiscono un grafoelemento tipico dello stadio N2 del sonno NREM. Si caratterizzano per una breve onda positiva iniziale, seguita da una componente negativa più lenta e ampia, con picchi a 350-500 ms e, infine, da un ulteriore picco positivo intorno ai 900 ms (Cash et al., 2009). I complessi K sono principalmente fenomeni spontanei, generati dalle oscillazioni lente corticali (< 1 Hz), ma possono anche essere indotti da stimolazioni sensoriali esterne. La loro funzione sembrerebbe essere quella di promuovere altre oscillazioni corticali, tra cui gli *sleep spindles* e le onde appartenenti alla banda di frequenza delta (Amzica & Steriade, 2002).

I *ripples* sono brevi oscillazioni ad alta frequenza (110-200 Hz), della durata di 50-100 ms. Si originano dall'interazione tra le subregioni CA3 e CA1 dell'ippocampo e, sovrapponendosi a onde ad ampio voltaggio (*sharp-waves*), danno vita ai complessi *sharp-wave ripples* (Staresina, 2024). Durante i *ripples* ippocampali si verificano delle riattivazioni dei pattern di scarica delle *place cells*, ovvero quelle configurazioni neurali che erano state precedentemente attivate durante la fase di codifica (Diba & Buzsáki, 2007). I complessi SW-R, di conseguenza, sono considerati elementi fondamentali nel processo di consolidamento mnestico, poiché facilitano il trasferimento delle informazioni apprese dall'ippocampo verso la neocorteccia, nello specifico nelle aree frontali ed associative (Adamantidis et al., 2019).

Nel paragrafo 2.2.1 si approfondirà come le oscillazioni lente, gli *sleep spindles* e gli

sharp-wave ripples si sincronizzano tra loro durante il sonno a onde lente (SWS) e come questo accoppiamento contribuisca al processo di consolidamento della memoria durante il sonno.

CAPITOLO 2

SONNO E MEMORIA

2.1 Il ruolo del sonno sul consolidamento mnestico

Il processo di apprendimento si suddivide in tre fasi: codifica, consolidamento (o ritenzione) e recupero (Nolen-Hoeksema et al., 2014). Mentre la codifica e il recupero risultano essere più efficaci durante la veglia, il sonno rappresenta una finestra ideale per permettere al cervello di ordinare e rinforzare le memorie appena codificate, in assenza di una continua stimolazione sensoriale dall'esterno. Questo consolidamento porta alla formazione di tracce mnestiche durature (engrammi), che vengono poi riattivate e recuperate durante la veglia (Rasch & Born, 2013; Girardeau & Lopes-dos-Santos, 2021).

Inizialmente si riteneva che il sonno agisse passivamente, limitandosi a proteggere le memorie dalle interferenze esterne (Jenkins & Dallenbach, 1924). Benson & Feinberg (1977) furono i primi a sottolineare come, durante il sonno, il cervello elabori attivamente le informazioni precedentemente codificate, sostenendo il loro consolidamento in modo efficace e duraturo attraverso specifici processi neurobiologici (Ellenbogen et al., 2006).

Il consolidamento della memoria si articola su due livelli: sinaptico e di sistema. Il consolidamento sinaptico si verifica in un intervallo temporale relativamente breve dopo l'apprendimento (minuti-ore) e comporta modificazioni durature nell'efficacia delle sinapsi coinvolte. Questi cambiamenti sono resi possibili dai processi cellulari di potenziamento a lungo termine (*Long-Term Potentiation*, LTP) e depressione a lungo termine (*Long-Term Depression*, LTD) che modulano la forza delle connessioni tra i circuiti neurali attivati durante l'apprendimento. Il consolidamento di sistema, invece, si verifica più lentamente e implica la riorganizzazione e ridistribuzione delle rappresentazioni neuronali tra l'ippocampo e le reti corticali (Rasch & Born, 2013; Diekelmann & Born, 2010). Durante quest'ultimo, le tracce mnestiche subiscono anche trasformazioni qualitative, come l'estrazione di caratteristiche invarianti (*gist*) o l'integrazione in schemi preesistenti (Staresina, 2024).

Il consolidamento durante il sonno avviene inoltre in modo selettivo, favorendo principalmente le memorie dichiarative, cioè quelle codificate in modo esplicito, le memorie difficili da apprendere o codificate debolmente, e quelle che hanno una rilevanza comportamentale (Diekelmann & Born, 2010; Born & Wilhelm, 2012).

Diverse evidenze indicano che il sonno a onde lente (SWS) possiede un ruolo preferenziale nel consolidamento delle memorie dichiarative, dipendenti dall'ippocampo, mentre il sonno REM sembra favorire il consolidamento delle memorie non dichiarative, tra cui quelle procedurali ed emotive (Rasch & Born, 2013; Born et al., 2006).

Tuttavia, questa distinzione nella letteratura più recente non appare così marcata come postulato inizialmente, portando a ritenere che entrambe le fasi del sonno contribuiscano attivamente alla modulazione delle tracce di memoria, a prescindere dalla loro natura (Yuksel et al., 2025; Davidson et al., 2021).

2.2 Ipotesi del consolidamento di sistema attivo

Secondo l'*active system consolidation hypothesis* (Diekelmann & Born, 2010; Born & Wilhelm, 2012; Marshall & Born, 2007), concettualmente basata sul modello del sistema di memoria a due stadi di Marr (1971), il consolidamento mnestico durante il sonno è il risultato di ripetute riattivazioni (*replay*) dei pattern neuronali precedentemente attivi durante la fase di codifica in veglia. Tali riattivazioni, che hanno origine a livello ippocampale, si verificano prevalentemente durante lo SWS e permettono il trasferimento delle informazioni, inizialmente immagazzinate in modo temporaneo nell'ippocampo, verso la corteccia, dove vengono consolidate a lungo termine e integrate con le conoscenze preesistenti (Rasch & Born, 2013) (Figura 2.1).

Studi sui ratti hanno mostrato che l'attività dell'ippocampo durante il sonno successivo all'apprendimento risulta cruciale non solo per il consolidamento delle memorie dichiarative, ma anche per quelle non ippocampo-dipendenti (Brodt et al., 2023). Un altro studio, sempre sui ratti ha mostrato che l'inibizione dell'attività ippocampale con un farmaco specifico (muscimolo) durante il sonno post-apprendimento comprometteva la prestazione in un test di riconoscimento effettuato a distanza di una settimana. Al contrario, l'inibizione dell'ippocampo durante la veglia successiva migliorava la performance mnestica, suggerendo che l'attività ippocampale durante la veglia possa interferire con la formazione di alcune memorie (Sawangjit et al., 2022).

Numerosi studi condotti su modelli animali hanno mostrato che, durante lo SWS, si verificano riattivazioni delle sequenze di attivazione neuronale precedentemente osservate in fase di apprendimento, specialmente nell'ippocampo, ma anche a livello di talamo, striato e corteccia. In linea con l'ipotesi dell'*active system consolidation*, queste riattivazioni seguono temporalmente quelle ippocampali (Born & Wilhelm, 2012).

Tuttavia, Rasch et al. (2007) furono i primi a fornire un'evidenza di un ruolo causale delle riattivazioni durante il sonno. In questo studio, ai partecipanti veniva richiesto di apprendere un compito visuo-spaziale (simile al gioco "Memory"), mentre veniva loro presentato un odore come stimolo contestuale. Quando lo stesso odore veniva ripresentato durante lo SWS, si verificava un miglioramento significativo nella performance di riconoscimento delle coppie di carte. Tale effetto, al contrario, non si osservava se l'odore veniva presentato durante il sonno REM o durante la veglia.

In sintesi, il modello può essere descritto attraverso i seguenti concetti principali: (a) la

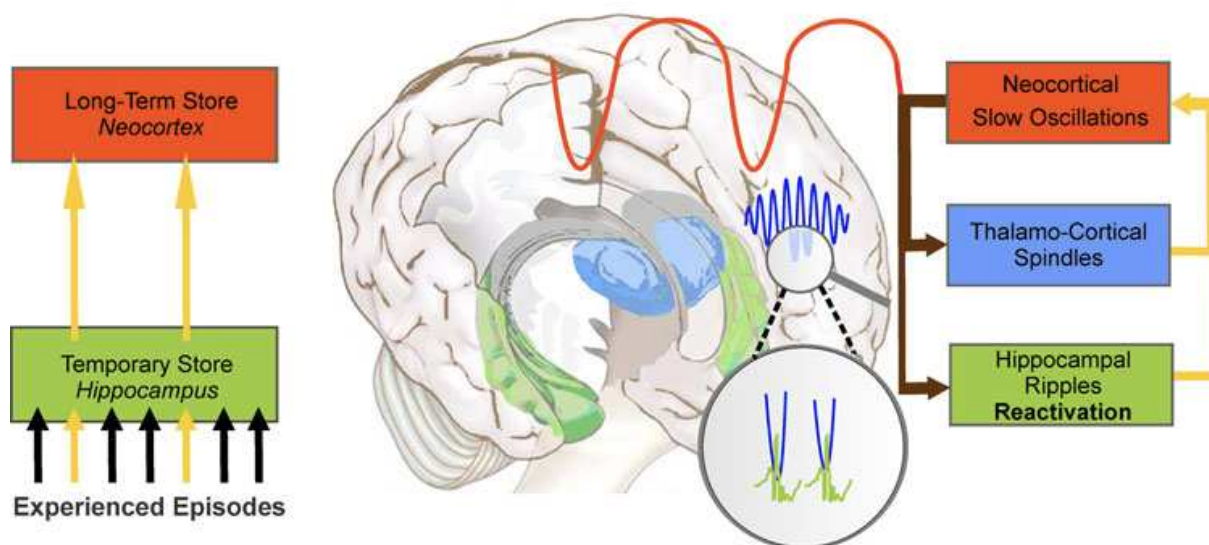


Figura 2.1: *Active System Consolidation Hypothesis*. Adattato da Born & Wilhelm (2012).

riattivazione delle tracce mnestiche è fondamentale per il consolidamento; (b) il consolidamento durante il sonno è un processo selettivo e non tutte le tracce vengono rafforzate; (c) le tracce mnestiche, una volta consolidate a lungo termine, subiscono cambiamenti qualitativi (Born & Wilhelm, 2012).

2.2.1 Accoppiamento dei ritmi del sonno: *SO-spindles-ripples*

Il consolidamento di sistema attivo, descritto nel capitolo precedente, è sostenuto dall'accoppiamento di tre oscillazioni che si manifestano prevalentemente durante lo SWS (Figura 2.2): le oscillazioni lente (SOs), gli *spindles* e i *ripples* (si veda 1.2.1 per una descrizione di queste onde). Attraverso un processo di tipo *top-down*, le oscillazioni lente, durante il loro *up-state* depolarizzante, forniscono una cornice temporale ottimale per l'innescare degli *spindles*. Questi ultimi, a loro volta, raggiungono le reti ippocampali e ne sincronizzano l'attività, favorendo l'emergere dei *ripples*. I *ripples* si verificano in corrispondenza dei minimi eccitabili (*troughs*) degli *spindles*, con una precisione temporale che risulta cruciale per la plasticità sinaptica. Contestualmente, si osservano anche processi *bottom-up*: i *ripples* ippocampali possono indurre la comparsa di oscillazioni lente nella corteccia prefrontale mediale, contribuendo alla riattivazione e al coordinamento dei circuiti corticali implicati nell'apprendimento precedente (Klinzing et al., 2019; Staresina et al., 2015; Brodt et al., 2023).

Durante l'apprendimento in veglia, i moduli corticali maggiormente coinvolti mostrano un aumento dell'eccitabilità sinaptica, che funge da *tag* e, parallelamente, l'ippocampo genera una copia dell'engramma corticale. Successivamente, durante lo SWS, gli *spindles* talamocorticali sembrano apparire con maggiore intensità proprio nei moduli corticali interessati, propagando

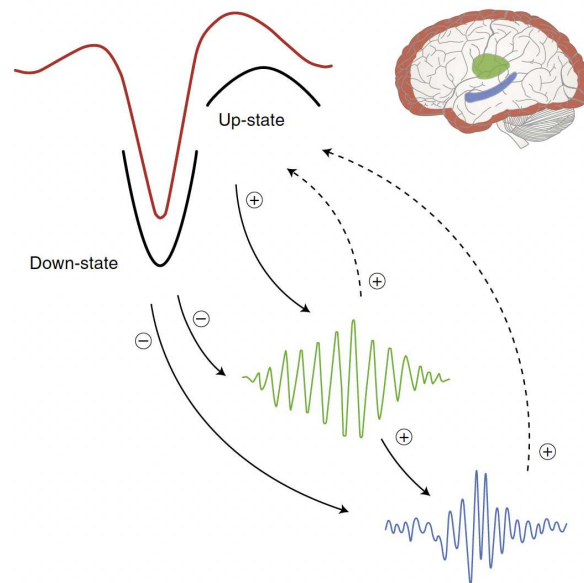


Figura 2.2: Accoppiamento dei ritmi durante il sonno a onde lente (SWS). In rosso le oscillazioni lente, in verde gli *spindles* e in blu i *ripples*. Le linee continue indicano i processi *top-down* mentre quelle tratteggiate i processi *bottom-up*. Adattato da Klinzing et al. (2019).

l'attività verso l'ippocampo, dove riattivano i corrispondenti engrammi e innescano i *ripples*. Questi ultimi si propagano nuovamente verso la corteccia, sincronizzandosi con gli *spindles* e rafforzando i nodi corticali dell'engramma. Tale circuito corteccia–ippocampo–corteccia permette il consolidamento delle tracce mnestiche a livello corticale, rendendo progressivamente meno necessario l'intervento dell'ippocampo, salvo in caso di modifiche della traccia mnestica stessa (Staresina, 2024).

Studi con stimolazione elettrica durante il sonno hanno mostrato benefici sul consolidamento mnestico, associati a un rafforzamento dell'accoppiamento tra onde lente, *spindles* e *ripples*, sia in ratti (Maingret et al., 2016) che in esseri umani (Ladenbauer et al., 2017; Geva-Sagiv et al., 2023)

2.3 Memoria e stimolazione sensoriale del sonno a onde lente

Sebbene durante il sonno il cervello non sia in grado di apprendere nuove informazioni esplicite, come parole o immagini, esso mantiene la capacità di elaborare stimoli esterni e di rafforzare i ricordi formati durante la veglia. Negli ultimi decenni, numerose ricerche hanno dimostrato che durante il sonno è possibile modulare l'attività cerebrale in modo mirato con il fine di potenziare i processi di consolidamento mnestico. A tal proposito, sono state sviluppate diverse tecniche di stimolazione sensoriale non invasiva che, attraverso stimoli sensoriali (uditivi, olfattivi...), permettono di modellare le oscillazioni del cervello dormiente. Già negli anni '30,

Davis et al. (1939) osservarono che stimoli acustici somministrati durante il sonno erano in grado di elicitar onde lente, complessi K e *spindles*. Più recentemente, è stato mostrato che anche stimoli olfattivi, come l'odore di lavanda, possono incrementare la quantità di sonno speso in SWS (Goel et al., 2005).

Sulla base di queste evidenze sono stati sviluppati due paradigmi sperimentali per la stimolazione cerebrale durante il sonno: la *Targeted Memory Reactivation* (TMR) e la stimolazione a circuito chiuso (CLAS). Più recentemente, è stato inoltre proposto un terzo approccio che integra i vantaggi di entrambi.

2.3.1 TMR (*Targeted Memory Reactivation*)

Il paradigma TMR consente di intervenire selettivamente nella riattivazione di specifiche tracce mnestiche durante il sonno, attraverso l'utilizzo di *cue* sensoriali associati ai contenuti appresi in precedenza. Durante la fase di codifica in veglia, un'informazione *target* da apprendere, come una parola o un'immagine, viene associata a un *cue* sensoriale, tipicamente un odore o un suono, con l'obiettivo di creare un legame tra il *cue* e il contenuto mnestico. Successivamente, generalmente durante il sonno a onde lente (SWS), lo stesso *cue* sensoriale viene ripresentato da solo. L'ipotesi alla base di questo paradigma è che la presentazione del *cue* durante il sonno favorisca la riattivazione selettiva dell'informazione *target* ad esso associata, favorendone il consolidamento (Cellini & Mednick, 2019).

La TMR può essere applicata utilizzando diversi tipi di stimoli sensoriali. Rasch et al. (2007) furono i primi a dimostrare un miglioramento della memoria visuospatiale attraverso la presentazione di *cue* olfattivi durante lo SWS. Uno studio successivo ha evidenziato che la TMR con stimoli olfattivi è associata a un aumento dell'attività delta a livello frontale e degli *spindles* rapidi a livello parietale (Rihm et al., 2014).

Nonostante l'efficacia di questa modalità, probabilmente dovuta alle connessioni dirette tra il sistema olfattivo e strutture come ippocampo, amigdala e talamo, la stimolazione olfattiva presenta alcune limitazioni significative. Tra queste vi sono la necessità di un periodo di *washout* tra una stimolazione e l'altra, per evitare effetti residui dovuti alla persistenza degli odori nell'ambiente e la difficoltà nel somministrarli con elevata precisione temporale. Al contrario, la stimolazione acustica non solo supera questi limiti, ma permette anche di essere integrata a dispositivi *wearable* e somministrata tramite modalità non invasive, come auricolari e altoparlanti (Cellini & Mednick, 2019).

Gli effetti benefici della TMR durante lo SWS sono stati osservati in diversi domini della memoria (Cellini & Capuozzo, 2018; Carbone & Diekelmann, 2024), tra cui la memoria dichiarativa (Schreiner & Rasch, 2015), la memoria procedurale (Rakowska et al., 2021) e quella emotiva (Xia et al., 2023). Inoltre, studi più recenti hanno impiegato la TMR in contesti

clinici, educativi e domestici (Carbone & Diekelmann, 2024).

La TMR agisce anche sulle oscillazioni lente che influenzano i processi di consolidamento mnemonico durante il sonno (si veda 2.2.1). In particolare, si osserva un aumento della potenza della SWA (*Slow Wave Activity*), così come dell'ampiezza e dell'intensità delle oscillazioni lente, insieme a un incremento della potenza nella banda sigma e della densità degli *spindles*. Inoltre, si registra un rafforzamento dell'accoppiamento tra le oscillazioni lente e gli *spindles* (Brodt et al., 2023).

Ulteriori aspetti importanti del paradigma TMR riguardano la necessità di un periodo di apprendimento, durante il quale viene stabilita l'associazione tra il *cue* e il *target* nella fase di veglia. Inoltre, è da considerare che la somministrazione di stimoli in successione potrebbe interferire con il processo di consolidamento della memoria, invece di potenziarlo. Infine, per ottenere miglioramenti significativi nella memoria, sembra essere necessario ripetere più volte la presentazione dei *cue* (Cellini & Mednick, 2019).

2.3.2 CLAS (*Closed-loop Auditory Stimulation*)

Rispetto ai paradigmi *open-loop*, indipendenti dall'attività cerebrale, come la TMR o la stimolazione ritmica, il paradigma CLAS (*Closed-Loop Auditory Stimulation*) offre un maggiore controllo temporale sulla stimolazione. Attraverso la registrazione in tempo reale dell'attività EEG, è possibile identificare con precisione le onde lente durante lo SWS. Questo permette di somministrare lo stimolo uditivo in modo accurato, sincronizzandolo con la fase desiderata dell'attività cerebrale. Grazie a questa elevata accuratezza temporale nella stimolazione, il paradigma CLAS rappresenta uno strumento particolarmente efficace per indagare il ruolo delle onde lente e degli eventi ad esse associati, come gli *spindles*, nei processi cognitivi legati al sonno (ad esempio, nel consolidamento mnemonico) (Esfahani et al., 2023).

Per realizzare un esperimento con il paradigma CLAS sono necessari tre elementi: (a) un sistema per il monitoraggio in tempo reale dell'attività cerebrale, (b) un algoritmo in grado di analizzare il segnale EEG e identificare le fasi specifiche delle oscillazioni da stimolare e (c) un sistema audio (cuffie o altoparlanti) per erogare i suoni nel momento opportuno (Esfahani et al., 2023).

La maggior parte degli studi con il paradigma CLAS ha impiegato brevi sequenze di rumore rosa (*pink noise*). Sebbene qualsiasi stimolo uditivo durante il sonno possa evocare risposte simili alle onde lente, specialmente complessi K, il rumore rosa sembra generare potenziali evocati più intensi e mostrare un effetto di abitudine inferiore in caso di stimolazioni ripetute (Debellemanière et al., 2022).

Ngo et al. (2013) sono stati i primi a impiegare il paradigma di stimolazione uditiva in *closed-loop* (CLAS). Nel loro studio hanno utilizzato brevi stimolazioni di rumore rosa della

durata di 50 ms e con un'intensità di 55 dB, somministrate durante l'*up-state* delle oscillazioni lente. Il sistema di stimolazione si basava su un algoritmo che utilizzava una soglia di ampiezza per identificare il *down-state* delle oscillazioni lente. Una volta individuata questa fase, l'algoritmo era in grado di predire in modo accurato il successivo *up-state*, durante il quale veniva erogato lo stimolo uditivo (*pink noise*). La stimolazione acustica sincronizzata con *up-state* nello studio ha provocato un aumento dell'ampiezza delle onde lente e della frequenza di occorrenza degli *spindles*, accompagnato da un maggior consolidamento delle tracce mnestiche rispetto a un equivalente tempo speso a dormire senza stimolazione. Al contrario, una stimolazione non allineata con l'*up-state* ha interferito con l'occorrenza delle onde lente e non ha prodotto benefici sulla memoria. Questi risultati sono stati ulteriormente replicati in un altro studio dello stesso gruppo (Ngo et al., 2015). Inoltre, la stimolazione CLAS applicata durante la transizione tra il *down-state* e l'*up-state* sembrerebbe favorire un maggiore accoppiamento tra le onde lente e gli *spindles*, in linea con studi precedenti che mostrano come la sincronia tra questi ritmi, più che la sola quantità di *spindles*, sia importante per il consolidamento (Esfahani et al., 2023)

Santostasi et al. (2016) hanno successivamente sviluppato un algoritmo predittivo per il CLAS basato su un "*phase-locked loop*" (PLL). Questo algoritmo era in grado di prevedere la fase delle oscillazioni lente calcolando continuamente la differenza tra il segnale reale (input) e un segnale generato dal sistema stesso (output). In questo modo il sistema riusciva a somministrare gli stimoli acustici (*pink noise* tra 30 e 48 dB) con elevata precisione nella transizione tra il *down-state* e l'*up-state* delle oscillazioni lente. Applicando questo sistema a una popolazione di giovani adulti (Ong et al., 2016) e di anziani (Papalambros et al., 2017), è stato registrato un incremento della SWA, accompagnato da un miglioramento nella performance nei compiti di memoria dichiarativa.

Un altro gruppo (Debellemaniere et al., 2018) ha utilizzato la CLAS attraverso un dispositivo EEG ambulatoriale (il Wireless Dreem Device; WDD) che applicava un *pink noise* tramite conduzione ossea durante la transizione tra il *down-state* e l'*up-state* delle oscillazioni lente (corrispondente a 45° nella fase ascendente). Il sistema ha impiegato un algoritmo di *machine learning* per identificare in tempo reale il sonno N3 e un algoritmo di *phase fitting*, ispirato a Cox et al. (2014a), per rilevare in tempo reale le oscillazioni lente. I risultati hanno mostrato una buona accuratezza del WDD nel rilevare N3 e nel somministrare i suoni nella fase desiderata rispetto alla polisonnografia (Arnal et al., 2020). Inoltre, la stimolazione ha indotto un aumento della SWA, effetto che si è mantenuto anche dopo 10 notti consecutive di stimolazione.

Studi recenti hanno confermato che la CLAS è in grado di provocare un aumento di ampiezza delle onde lente e dell'attività nello spettro di frequenza degli *spindles*. Tuttavia, per quanto riguarda gli effetti sul consolidamento della memoria, non sono stati osservati sistematicamente miglioramenti significativi (Schneider et al., 2020; Harrington et al., 2021; Koo-Poeggel et al., 2022).

2.3.3 CL-TMR (*Closed-loop Targeted Memory Reactivation*)

Sia la TMR che il paradigma CLAS si sono dimostrati efficaci nel modulare le oscillazioni lente, gli *spindles* e la loro sincronizzazione, promuovendo spesso il consolidamento mnestico. Tuttavia, ciascun approccio presenta limiti specifici. In tal senso, il paradigma CL-TMR (*Closed-Loop Targeted Memory Reactivation*) combina i punti di forza di entrambi: le potenzialità della TMR di riattivare selettivamente specifiche tracce mnestiche, tramite l'associazione tra un *cue* sensoriale e un contenuto *target* da apprendere, e il controllo temporale preciso offerto dalla CLAS, che consente di sincronizzare la stimolazione con le oscillazioni lente (Cellini & Mednick, 2019; Carbone & Diekelmann, 2024).

Numerosi studi hanno riportato risultati promettenti sull'efficacia della CL-TMR, evidenziando come il corretto *timing* nella presentazione del *cue* durante lo SWS sia un fattore cruciale nel determinare i benefici della TMR sul consolidamento.

In uno studio di Göldi et al. (2019), i partecipanti hanno appreso 120 coppie di parole, ciascuna composta da un termine in olandese e la rispettiva traduzione in tedesco. Successivamente, durante lo SWS, 80 parole in olandese venivano ripresentate acusticamente tramite un sistema *closed-loop*, sincronizzato agli *up-state* o ai *down-state* delle SO. Gli *up-state* e i *down-state* venivano rilevati rispettivamente quando il segnale scendeva sotto la soglia di $-75 \mu\text{V}$ per i primi e quando superava $+10 \mu\text{V}$ per i secondi. I risultati hanno mostrato che le parole presentate durante gli *up-state* sono state ricordate meglio rispetto alle parole che non sono state ripetute (condizione di controllo), mentre la stimolazione durante i *down-state* non ha prodotto benefici evidenti. Tuttavia, non è emersa una differenza significativa diretta tra le due condizioni (*down-state* e *up-state*). A livello di EEG, le parole presentate negli *up-state* hanno prodotto un incremento significativo dell'attività theta (5–8 Hz) rispetto alle parole non stimolate, ma non rispetto a quelle stimolate durante i *down-state*. Nella banda degli *spindles* (11–15 Hz), invece, è stato osservato un aumento di potenza significativo sia rispetto alle parole non stimolate che a quelle stimolate durante i *down-state*.

Ulteriori evidenze a sostegno dell'efficacia della stimolazione durante gli *up-state* provengono dallo studio di Ngo & Staresina (2022), i quali hanno utilizzato 120 associazioni tra verbi e un set di 6 immagini ripetute, ciascuna accompagnata da un suono semanticamente congruente (ad esempio, automobile e suono di accensione del motore). Gli stimoli erano suddivisi in tre categorie semantiche: oggetti, luoghi e parti del corpo. Durante lo SWS venivano riprodotti due suoni, ciascuno appartenente a una categoria diversa, sincronizzati rispettivamente con l'*up-state* o il *down-state* delle oscillazioni lente. Inoltre, un suono inedito veniva presentato in entrambe le fasi, fungendo da condizione di controllo. I risultati comportamentali hanno evidenziato un effetto protettivo della stimolazione durante gli *up-state*, con una significativa riduzione dell'oblio notturno rispetto alla stimolazione nei *down-state*. A livello elettrofisiologico, la sti-

molazione negli *up-state* ha determinato un prolungamento della fase *up* e un incremento della potenza nella banda di frequenza degli *spindles*.

Anche studi che hanno investigato gli effetti della CL-TMR sulla memoria spaziale e procedurale hanno riportato risultati coerenti con quelli precedenti. Shimizu et al. (2018) hanno applicato la TMR durante la transizione dallo stato *down* allo stato *up* delle SO, dopo un compito di navigazione spaziale in realtà virtuale accompagnato da segnali acustici. I risultati hanno evidenziato un miglioramento nei tempi medi di navigazione già dal giorno successivo all'apprendimento, insieme a un aumento dell'attività degli *spindles* rapidi (12–15 Hz), soprattutto nelle regioni frontali e parietali. In un secondo studio, Abdellahi et al. (2023) hanno utilizzato un compito di memoria procedurale (SRTT) e impiegato stimolazioni acustiche durante lo SWS, dimostrando che i *cue* somministrati durante l'*up-state* delle oscillazioni lente aumentavano la probabilità di riattivazioni neurali.

Al contrario, Wang et al. (2022), in uno studio in cui i partecipanti apprendevano coppie di parole in tedesco, nel quale la prima sillaba della prima parola veniva utilizzata come *cue* e ripresentata durante lo SWS, non hanno rilevato differenze significative nel consolidamento della memoria né tra parole *cued* e *uncued*, né tra stimolazione durante l'*up-state* o il *down-state*. Le analisi EEG hanno mostrato un aumento dell'attività nella banda degli *spindles* in entrambe le condizioni, suggerendo che l'elaborazione neurale avvenga indipendentemente dalla fase della stimolazione.

Nel complesso, queste evidenze indicano che, nonostante i risultati comportamentali della CL-TMR non siano sempre concordi nel determinare un beneficio sul consolidamento mnestico, la sincronizzazione tra la presentazione del *cue* e le fasi dell'onda lenta gioca un ruolo chiave, mostrando effetti più favorevoli quando la stimolazione viene somministrata durante gli *up-state*.

CAPITOLO 3

LA RICERCA

3.1 Introduzione

Come discusso nei capitoli precedenti, il sonno a onde lente (SWS), fase più profonda del sonno NREM, gioca un ruolo cruciale nel consolidamento della memoria. In questo stadio, le informazioni apprese di recente vengono riattivate attraverso un dialogo coordinato tra ippocampo e neocorteccia (Rasch & Born, 2013; Klinzing et al., 2019).

Elemento chiave di questo processo sono le oscillazioni lente (SO; <1 Hz), che alternano fasi di inattività neuronale (*down-state*) e fasi di attività sincronizzata (*up-state*). È proprio durante gli *up-state* che si realizza l'accoppiamento temporale tra le SO, gli *sleep spindles* (12–16 Hz) e i *ripples* ippocampali (80–140 Hz), meccanismo ritenuto fondamentale per la riattivazione delle tracce mnestiche a livello ippocampale e la loro integrazione nelle reti corticali a lungo termine (Klinzing et al., 2019; Staresina, 2024).

Negli ultimi due decenni, sulla base delle evidenze raccolte circa il ruolo delle oscillazioni lente, sono state sviluppate tecniche di stimolazione acustica non invasiva durante il sonno per potenziarne l'attività e favorire il consolidamento della memoria. Tra queste, la *Targeted Memory Reactivation* (TMR) e la *Closed-Loop Auditory Stimulation* (CLAS) si sono dimostrate particolarmente efficaci (Cellini & Mednick, 2019). Sebbene la TMR abbia prodotto effetti positivi anche quando implementata in modalità *open-loop*, ovvero non sincronizzata con specifici eventi cerebrali rilevati tramite EEG (Hu et al., 2020), i risultati più promettenti sono stati ottenuti quando gli stimoli TMR venivano presentati durante l'*up-state* delle oscillazioni lente, ovvero in modalità *closed-loop* (Batterink et al., 2016).

Gli studi che hanno utilizzato la TMR in modalità *closed-loop* (CL-TMR), mediante algoritmi in grado di rilevare in tempo reale l'*up-state* delle SO, hanno confermato che la stimolazione in questa fase incrementa l'attività a onde lente, aumentando sia l'ampiezza sia la probabilità di occorrenza. Inoltre, è stato osservato un potenziamento della potenza nella banda di frequenza degli *spindles*, fenomeni entrambi associati a un miglioramento delle prestazioni mnestiche (Göldi et al., 2019; Ngo & Staresina, 2022; Shimizu et al., 2018). Tuttavia, tali effetti non sono stati riportati con coerenza in tutti gli studi (Wang et al., 2022; Cox et al., 2014b).

Finora, gli esperimenti che hanno utilizzato il paradigma CL-TMR sono stati condotti in ambienti di laboratorio controllati. Nonostante ciò, la sua efficacia in contesti domestici, più ecologicamente validi, rimane ancora poco esplorata. Il presente studio si propone di applicare il paradigma CL-TMR in un ambiente domestico, utilizzando la fascia EEG ZMax, un dispositivo *wearable* in grado di rilevare in tempo reale l'*up-state* delle oscillazioni lente e di somministrare

stimoli acustici sincronizzati con tale fase. L'obiettivo principale è verificare se una stimolazione acustica con stimoli TMR, erogata durante gli *up-state* in un contesto domestico, sia in grado di modulare l'attività a onde lente e aumentare la potenza nella banda di frequenza degli *spindles*, replicando quanto osservato negli studi di laboratorio (Göldi et al., 2019; Ngo & Staresina, 2022; Shimizu et al., 2018). Nello specifico, ci si aspetta che la stimolazione sincronizzata con l'*up-state* delle oscillazioni lente aumenti sia l'ampiezza che la potenza di queste onde, oltre a incrementare la potenza nella banda di frequenza degli *sleep spindles* associati.

Una seconda ipotesi, di natura più esplorativa, riguarda la possibilità che gli stimoli TMR somministrati durante il sonno producano risposte EEG differenti in base al fatto che, prima di dormire, i partecipanti ricordassero o meno la traduzione associata a questi stimoli presentati precedentemente nel compito di apprendimento del vocabolario (*Word-Pseudoword Association Learning task*, WPAL). In particolare, si ipotizza che le parole di cui il partecipante ricordava la traduzione dopo il primo test (T0) (*Remembered*) generino una risposta evocata distinta rispetto a quelle di cui non ricordava la traduzione (*Not Remembered*), suggerendo che l'elaborazione cerebrale degli stimoli sia influenzata dalle tracce mnestiche formatesi.

3.2 Materiali e Metodi

3.2.1 Partecipanti

Allo studio hanno preso parte 10 partecipanti volontari (età media = 21.6 ± 1.1 ; 6 femmine), reclutati sulla base dei seguenti criteri di inclusione: essere di madrelingua italiana, non presentare disturbi neurologici o psicologici diagnosticati, essere buoni dormitori, non presentare ripetuti risvegli durante la notte, dormire da soli e non fare uso di farmaci. Inoltre, sono stati selezionati esclusivamente individui con una durata abituale del sonno compresa tra 7 e 8 ore per notte e con un orario di addormentamento compreso tra le 23:00 e le 00:00. Per verificare l'idoneità dei partecipanti in relazione ai criteri sopra indicati, nei 3-4 giorni prima dell'inizio dell'esperimento è stata richiesta la compilazione di una serie di questionari online. Tali strumenti erano finalizzati a valutare la qualità del sonno, i sintomi di insonnia, la sonnolenza diurna, il cronotipo, nonché sintomi di stress, ansia e depressione. Inoltre, è stato incluso un questionario per analizzare aspetti legati alla metamemoria.

Nello specifico, i questionari utilizzati sono stati: il *Pittsburgh Sleep Quality Index* (PSQI) (Buysse et al., 1989; Curcio et al., 2013), l'*Insomnia Severity Index* (ISI) (Morin et al., 2011; Castronovo et al., 2016), l'*Epworth Sleepiness Scale* (ESS) (Johns, 1991; Vignatelli et al., 2003), il *Morningness-Eveningness Questionnaire reduced version* (r-MEQ) (Natale et al., 2006), il *Depression, Anxiety and Stress Scale - 21 Items* (DASS-21) (Lovibond & Lovibond, 1995; Bottesi et al., 2015) e il *Multifactorial Memory Questionnaire* (MMQ) (Troyer & Rich, 2002;

Raimo et al., 2016).

Infine, ai partecipanti è stato richiesto di mantenere orari regolari di addormentamento e risveglio per tutta la durata dell'esperimento. Il rispetto di tali orari è stato monitorato tramite la compilazione quotidiana di un diario del sonno.

Tutti i partecipanti hanno preso visione del consenso informato alla partecipazione e al trattamento dei dati a scopo di ricerca.

3.2.2 Compito sperimentale

È stato utilizzato un compito di apprendimento del vocabolario (*Word-Pseudoword Association Learning task*, WPAL), ispirato a studi precedenti che hanno utilizzato il paradigma CL-TMR (Salfi et al., 2025). Il WPAL, programmato con PsychoPy (Peirce et al., 2019) e somministrato a distanza tramite la piattaforma Pavlovia, prevede l'apprendimento di 40 coppie formate da una pseudoparola presentata uditivamente e dalla sua traduzione in italiano. Il compito sperimentale ha due versioni (*set A* e *set B*), contenenti coppie di parole diverse ma con difficoltà equivalente. I partecipanti sono stati assegnati casualmente a uno dei due *set*. Le liste di pseudoparole sono state generate con il software *Wuggy* (Keuleers & Brysbaert, 2010) e bilanciate per grado di somiglianza con parole reali (*wordlikeness*), numero di lettere e struttura consonante-vocale.

Prima di iniziare il WPAL, tutti i partecipanti hanno svolto lo *Psychomotor Vigilance Task* (PVT) (Loh et al., 2004), della durata di 5 minuti. In questo compito viene chiesto di premere la barra spaziatrice non appena appare sullo schermo un contatore che misura il tempo di reazione prima della pressione della barra. Il PVT serve a verificare che una scarsa performance nel WPAL non dipenda da un basso livello di vigilanza.

La sonnolenza soggettiva è stata inoltre misurata tramite la *Karolinska Sleepiness Scale* (KSS) (Åkerstedt & Gillberg, 1990), in cui i partecipanti valutano il proprio livello di sonnolenza su una scala a 9 punti (da 1 = "Estremamente vigile" a 9 = "Estremamente sonnolento").

Il WPAL si articola in tre fasi: *Encoding* (E), *Learning* (L) e *Test* (T) (Figura 3.1). Durante l'intero esperimento ogni partecipante ha completato 1 fase di *Encoding*, 3 fasi di *Learning* (L0-L2) e 7 fasi di *Test* (T0-T6) (Figura 3.2). Durante la fase di *Encoding*, le pseudoparole vengono riprodotte tramite gli altoparlanti del computer e, immediatamente dopo, compare a schermo la relativa traduzione italiana (ad esempio, gnufo-dottore). Subito dopo, la pseudoparola viene ripetuta acusticamente e il partecipante deve digitare la traduzione entro 10 secondi. Viene poi fornito un *feedback*. Nella successiva fase di *Learning*, le stesse pseudoparole vengono ripresentate in forma uditiva e il partecipante deve provare a ricordare la traduzione e digitarla. La risposta corretta viene poi mostrata come *feedback*. Durante il *Learning*, tutte le 40 coppie

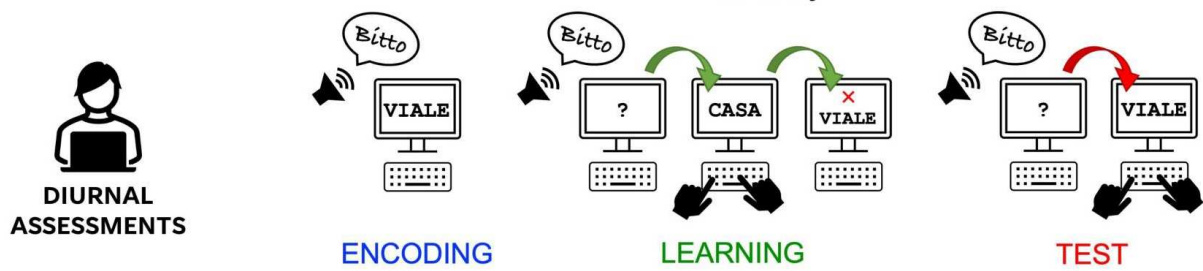


Figura 3.1: Rappresentazione grafica del *Word-Pseudoword Association Learning task* (WPAL)

vengono presentate due volte. Infine, nella fase di *Test*, il partecipante ascolta la pseudoparola e deve fornire la relativa traduzione, senza ricevere alcun *feedback*, unica differenza rispetto alla fase di *Learning*.

Nei giorni successivi alla prima sessione sperimentale, le sessioni mattutine prevedevano solo la fase di *Test*, mentre quelle pomeridiane sia il *Learning* che il *Test*.

Le risposte contenenti errori di battitura (ad esempio, “olivo” anziché “ulivo”) sono state considerate corrette.

3.2.3 Procedura Sperimentale

Lo studio ha adottato un disegno sperimentale *within-subjects*, in cui tutti i partecipanti hanno preso parte a una prima notte di *sham* (senza stimolazione), seguita da tre notti di stimolazione acustica secondo il paradigma CL-TMR (si veda 3.2.5 per una descrizione dettagliata del protocollo di stimolazione). Ogni sessione sperimentale è dunque durata quattro notti e cinque giorni, con un *retest* a una settimana di distanza dall’ultimo giorno. L’intero esperimento si è svolto presso l’abitazione di ciascun partecipante e tutti i compiti sperimentali sono stati svolti dal partecipante in collegamento Zoom con uno sperimentatore.

Al mattino, dopo ciascuna delle 4 notti sperimentali, e anche la mattina del *retest*, i partecipanti compilavano un diario del sonno tramite *Google Forms*, rispondendo a domande relative alla notte appena trascorsa. Venivano raccolte informazioni quali: orario in cui si erano coricati, orario di addormentamento, numero e durata dei risvegli notturni, orario del risveglio e orario in cui si erano alzati dal letto. Inoltre, veniva chiesto se avessero dormito indossando la fascia EEG ZMax, quanto ritenevano che la notte fosse stata disturbata dalla fascia, e se durante la notte avessero percepito alcune delle parole emesse dagli altoparlanti.

Nel corso della giornata precedente alla prima notte di adattamento, a ciascun partecipante, selezionato secondo i criteri di inclusione descritti nella sezione 3.2.1, veniva consegnata la strumentazione necessaria (fascia EEG, computer ed amplificatori) e venivano fornite istruzioni sia sull’allestimento del *setting* sperimentale nella propria camera, sia sul montaggio della fascia EEG ZMax (si veda la sezione 3.2.4 per specifiche sulla fascia). Una volta ricevute le spiegazioni

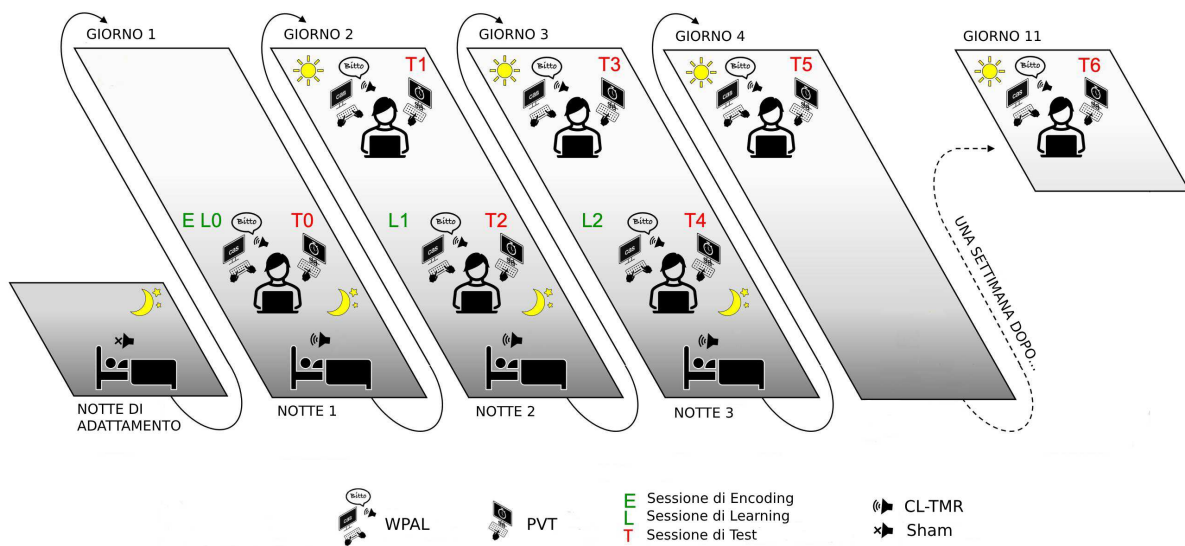


Figura 3.2: Rappresentazione grafica della procedura sperimentale. Le sessioni mattutine si svolgevano sempre un'ora dopo il risveglio di ciascun partecipante, mentre quelle pomeridiane avevano luogo alle 18:30.

e le rispettive guide cartacee, i partecipanti portavano a casa la strumentazione e l'esperimento poteva iniziare.

Durante la prima notte (*Baseline night*), quella di adattamento, i partecipanti dovevano dormire indossando la fascia EEG ZMax, senza tuttavia ricevere alcuna stimolazione durante il sonno. La sera del giorno 1, intorno alle 18:30, veniva somministrata, in collegamento con lo sperimentatore, la prima serie di task del WPAL, sempre preceduta dal PVT. La sessione comprendeva una fase di *Encoding* (E), una fase di *Learning* (L0) e una fase di *Test* (T0). Durante le tre notti successive (*night 1,2,3*), i partecipanti dormivano indossando la fascia EEG ZMax, questa volta ricevendo la stimolazione acustica secondo il paradigma CL-TMR. Nei giorni 2 e 3 e nella mattina del giorno 4, i partecipanti svolgevano le fasi di *Test* (T1, T3, T5) al mattino, e le fasi di *Test* (T2, T4) alla sera, precedute da una fase di *Learning* (L1, L2). Infine, dopo una settimana dal quarto giorno, in cui i partecipanti tornavano a dormire normalmente senza la fascia EEG ZMax, veniva somministrato un ultimo *Test* (T6), utile per valutare eventuali effetti a lungo termine (Figura 3.2).

La mattina del giorno 4, dopo aver svolto il *Test* (T5) i partecipanti riconsegnavano la strumentazione agli sperimentatori.

3.2.4 Registrazione EEG

Lo strumento di registrazione EEG utilizzato in questo studio è rappresentato dalla fascia ZMax (Hypnodyne Corp.), un dispositivo EEG progettato per la polisonnografia portatile, im-

piegato per registrare i dati EEG dei partecipanti durante le 4 notti sperimentali nelle proprie abitazioni. La fascia ZMax veniva applicata autonomamente dai partecipanti, ai quali era stata precedentemente illustrata la procedura di posizionamento degli elettrodi. Il dispositivo registrava l'attività EEG di due elettrodi frontali (F8 e Fpz), referenziati al mastoide controlaterale. Oltre al segnale EEG, la fascia ZMax è in grado di acquisire anche la frequenza cardiaca (tramite un sensore di fotopleletismografia), la temperatura, la luminosità ambientale, il suono e i movimenti corporei. Tuttavia, questi segnali non sono stati analizzati nel presente studio. I dati EEG sono stati campionati a 256 Hz.

Per effettuare il montaggio della fascia, i partecipanti dovevano innanzitutto eseguire uno *scrub* sulle aree della fronte interessate per migliorare la conduttività del segnale. Successivamente, gli elettrodi venivano posizionati sulle aree di interesse. La fascia veniva infine legata, fissandola al centro della fronte.

Dopo aver effettuato il montaggio della fascia, quando erano pronti per andare a dormire, i partecipanti avviavano il software ZMax HDRecorder che, tramite un ricevitore wireless, permetteva di visualizzare e salvare in tempo reale i dati registrati dalla fascia.

3.2.5 Protocollo di stimolazione CL-TMR

La stimolazione CL-TMR è stata applicata utilizzando il software *EventIDE* (Okazolab Ltd., Londra, UK), che consente l'elaborazione in tempo reale del segnale EEG. Per modellare la stimolazione è stato preso come riferimento il canale Fpz integrato nella fascia ZMax. Durante le notti di stimolazione, ogni volta che si verificava una specifica condizione, ovvero la detezione di 5 onde lente nell'arco di 2 minuti (indicativo di un probabile stato di SWS), le pseudoparole venivano presentate attraverso gli altoparlanti integrati nella fascia ZMax. Gli stimoli erano temporizzati in prossimità della fase 0° dell'oscillazione lenta (Figura 3.3), corrispondente alla metà della fase ascendente (*up-state*), in linea con quanto indicato da precedenti studi in letteratura (Göldi et al., 2019; Abdellahi et al., 2023).

La stimolazione veniva avviata 20 minuti dopo l'inizio della registrazione ed interrotta 5 ore dopo, definendo così una finestra temporale volta a massimizzare la probabilità di rilevare fasi di SWS. Tra due stimolazioni consecutive era previsto un intervallo (ISI) di 2 secondi. La pressione sonora degli stimoli era regolata tra i 42 e 50 dB, in linea con la letteratura attuale sul paradigma CL-TMR, in modo da garantire che il suono fosse chiaramente percepibile senza disturbare la continuità del sonno (Hu et al., 2020; Stanyer et al., 2022).

Gli stimoli acustici erano costituiti dalle 40 pseudoparole di cui i partecipanti dovevano ricordare la traduzione durante il WPAL. Questi stimoli sono stati generati utilizzando la funzione di sintesi vocale (*text-to-speech*) di *Microsoft Word* e successivamente campionati con il software *Audacity* (link). La durata di ciascuno stimolo era di 500 millisecondi ed è stata ottenuta

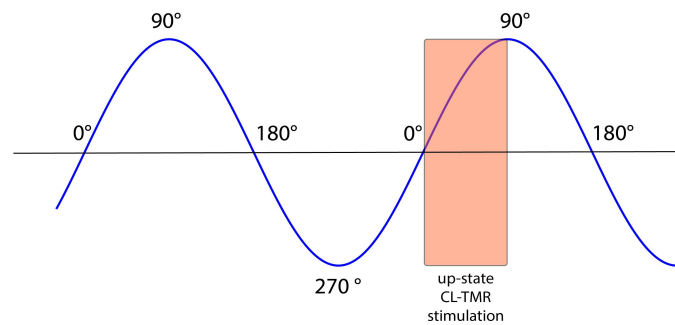


Figura 3.3: Esempio di finestra di presentazione dello stimolo TMR durante l'*up-state* dell'oscillazione lente secondo l'algoritmo utilizzato.

accelerando la pronuncia delle parole senza alterarne il tono.

Per ogni partecipante, dopo il primo *Test* (T0) venivano selezionate casualmente alcune delle 40 pseudoparole per essere sottoposte a stimolazione durante le tre notti seguenti. Tra queste vi erano metà delle pseudoparole di cui il partecipante aveva ricordato correttamente la traduzione a T0 (*Remembered*), e metà delle pseudoparole di cui non aveva ricordato la traduzione a T0 (*Not Remembered*), al fine di ottenere un numero di parole stimulate corrispondente a 20. L'identificazione delle pseudoparole per ogni partecipante avveniva dopo T0 e rimaneva invariata per l'intera procedura sperimentale.

3.2.6 Pre-processamento del segnale EEG

Il pre-processamento dei dati EEG è stato effettuato usando il *toolbox* EEGLAB in Matlab (Delorme & Makeig, 2004). È stato applicato un filtro passa banda tra 0.3 e 35 Hz. In seguito, il segnale è stato segmentato in epoche della durata di 5 secondi, comprese tra -3 e +2 secondi rispetto alla presentazione dello stimolo.

La rimozione automatica degli artefatti è stata eseguita utilizzando le funzioni *pop_rejspec* e *pop_eegthresh* di EEGLAB. La prima ha permesso di escludere le epoche con potenza al di fuori dell'intervallo compreso tra -30 dB e +30 dB, nel range di frequenze tra 20 e 35 Hz. La seconda ha invece rimosso le epoche con ampiezze superiori a $\pm 400 \mu\text{V}$ nell'intervallo temporale tra -2 e +2 secondi rispetto alla presentazione dello stimolo. Infine, le epoche rimanenti sono state ispezionate visivamente e le eventuali epoche nelle quali erano presenti artefatti sono state rimosse manualmente.

Per ciascun partecipante e ciascuna notte sperimentale sono stati calcolati i potenziali evocati medi (ERPs) sull'elettrodo Fpz. Ogni ERP è stato attribuito a una delle due condizioni (*Remembered* o *Not Remembered*) in base alle risposte al *test* WPAL raccolte dopo T0: in particolare, gli stimoli *Remembered* corrispondevano alle pseudoparole per le quali, al tempo

T0, il partecipante era stato in grado di ricordare correttamente la parola *target* associata, mentre gli stimoli *Not Remembered* erano quelli per cui l'associazione non era stata richiamata correttamente.

Le rappresentazioni tempo-frequenza (TF) sono state calcolate tramite la funzione *newtimef* di EEGLAB, considerando frequenze comprese tra 1 e 30 Hz con *step* di 0,2 Hz. La normalizzazione delle TF è stata effettuata utilizzando una baseline compresa tra -2 e -1.5 secondi antecedenti la comparsa dello stimolo. Analogamente agli ERPs, per ogni notte di stimolazione di ciascun partecipante è stata calcolata una TF media, assegnata a una delle due condizioni: *Remembered* o *Not Remembered*.

Per le notti *sham* (prive di stimolazione), le stesse operazioni sul segnale sono state effettuate in corrispondenza degli istanti in cui l'algoritmo avrebbe erogato la stimolazione nel caso si fosse trattato di una notte con stimolazione. Questi eventi sono stati poi comparati agli eventi delle notti con stimolazione (a prescindere dalla condizione delle parole) al fine di analizzare l'effetto su ampiezza e spettro di frequenze della stimolazione.

3.2.7 Analisi EEG

Le analisi statistiche sui dati EEG, relative sia ai potenziali evento-relati (ERPs) sia alle risposte tempo-frequenza (TF), sono state condotte utilizzando un approccio non parametrico basato su *cluster-based permutation tests*, al fine di controllare adeguatamente il problema delle comparazioni multiple (MCP) (Maris & Oostenveld, 2007). Tutte le analisi sono state eseguite con il toolbox FieldTrip in MATLAB (Oostenveld et al., 2011), prendendo come riferimento l'elettrodo Fpz.

Per l'analisi dei potenziali evento-relati (ERPs), è stata calcolata la media degli ERP per ciascuna condizione a livello di singolo soggetto. A livello di gruppo, il confronto tra condizioni è stato effettuato mediante la funzione *ft_timelockstatistics*. Questo approccio è stato utilizzato per confrontare gli ERP relativi agli stimoli TMR vs *Sham*, con l'obiettivo di valutare la risposta corticale evocata dalla stimolazione acustica, e quelli relativi agli stimoli *Remembered* vs *Not Remembered*, al fine di indagare se l'attività evocata variasse in funzione dell'avvenuta acquisizione dell'associazione tra la pseudoparole (*cue*) e la corretta traduzione (*target*). Per ciascun confronto, è stata condotta una randomizzazione delle etichette delle condizioni tra i soggetti, con $n = 1000$ permutazioni. Per ogni permutazione è stato ricalcolato il *p-value* tramite t-test appaiato, generando così una distribuzione nulla. Il *p-value* osservato è stato quindi confrontato con questa distribuzione per ottenere un *p-value* empirico. Per limitare il rischio di errori di primo tipo dovuti ai confronti multipli, è stata applicata la correzione *False Discovery Rate* (FDR) con soglia di significatività fissata a $q < 0.05$.

Per l'analisi tempo-frequenza (TF), i confronti statistici tra le condizioni TMR vs *Sham* e

Remembered vs Not Remembered sono stati effettuati utilizzando la funzione *ft_freqstatistics*, adottando anche in questo caso un t-test per misure ripetute con 1000 permutazioni Monte Carlo. La correzione per confronti multipli è stata effettuata tramite procedura FDR, applicata esternamente alla funzione statistica con la funzione *fdr_bh*, con una soglia di significatività impostata a $q < 0.01$.

3.3 Risultati

3.3.1 Caratteristiche demografiche

Dei 10 partecipanti inizialmente inclusi nel campione sperimentale, uno di essi non ha completato lo studio, mentre un altro è stato escluso a causa di problemi tecnici che hanno impedito la somministrazione di un numero sufficiente di stimolazioni (meno di un ciclo di parole completato per notte). Pertanto, le analisi EEG sono state effettuate su un totale di 8 partecipanti (età media = 21.5 ± 1.2 ; 5 femmine). La tabella 3.1 presenta un riepilogo delle caratteristiche demografiche e dei punteggi ottenuti ai questionari di *screening* relativi agli 8 partecipanti su cui sono state condotte le analisi.

Ciascun partecipante ha ricevuto in media 335 (± 204) stimoli TMR per notte, di cui 190 (± 168) appartenenti alla condizione *Remembered* e 145 (± 114) alla condizione *Not Remembered*.

Tabella 3.1: Caratteristiche demografiche e di tratto del campione

	Media \pm SD		Media \pm SD
Età (anni)	21.50 ± 1.20	ISI	2.38 ± 1.51
Genere (F/M)	5/3	rMEQ	15.75 ± 2.25
DASS-21 Ansia	1.63 ± 1.41	ESS	6.75 ± 3.49
DASS-21 Depressione	2.25 ± 1.91	MMQ Soddisfazione	29.25 ± 4.17
DASS-21 Stress	3.25 ± 2.12	MMQ Abilità	60.5 ± 6.70
PSQI	3.50 ± 1.07	MMQ Strategie	28.38 ± 8.23

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard. DASS-21: *Depression, Anxiety and Stress Scale-21 Items*; PSQI: *Pittsburgh Sleep Quality Index*; ISI: *Insomnia Severity Index*; rMEQ: *Morningness-Eveningness Questionnaire reduced version*; ESS: *Epworth Sleepiness Scale*; MMQ: *Multifactorial Memory Questionnaire*.

3.3.2 Potenziali Evento-Relati Uditivi

Il confronto tra le condizioni TMR e *Sham*, effettuato mediante *cluster-based permutation tests*, non ha rivelato effetti statisticamente significativi ($q > 0.05$, FDR-corrected). Nonostante

l'assenza di significatività statistica, a livello visivo, la condizione TMR sembra mostrare un'onda lenta post-stimolo caratterizzata da un primo picco negativo a una latenza di ~ 640 ms ed un secondo picco positivo a ~ 1250 ms. (Figura 3.4a). Il confronto tra le condizioni *Remembered* e *Not Remembered* non ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'ERP ($q > 0.05$, FDR-corrected) (Figura 3.4b)

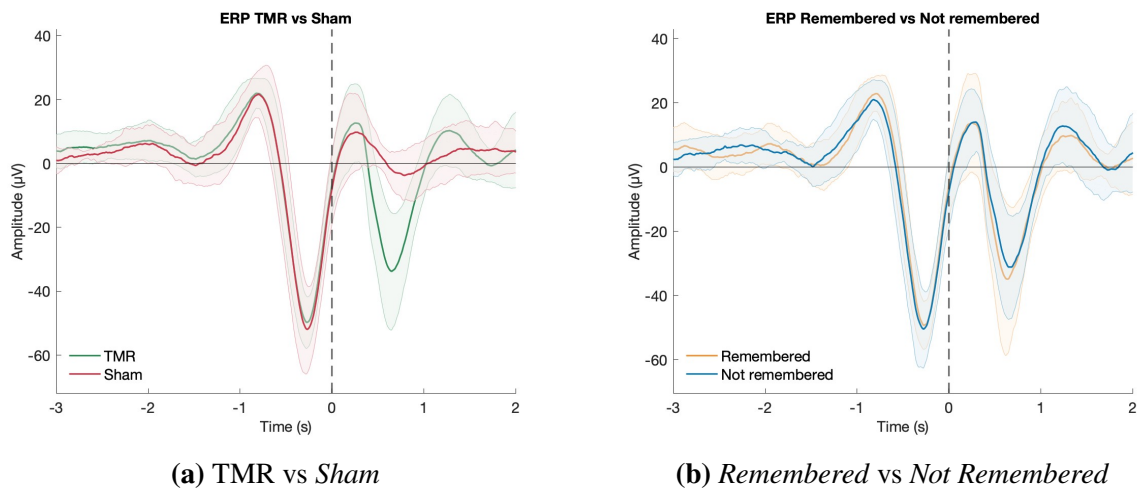


Figura 3.4: (a) Potenziali evento-relati (ERP) in risposta alla stimolazione TMR (linea verde) confrontati con la condizione *Sham* (linea rossa). (b) Confronto tra gli ERP delle parole *Remembered* (linea gialla) e quelli relativi alle parole *Not Remembered* (linea blu). Le linee ombreggiate attorno alla media rappresentano le deviazioni standard. La linea tratteggiata raffigura l'inizio dello stimolo ($t = 0$).

L'analisi tempo-frequenza (TF) tra le condizioni TMR e *Sham* (Figura 3.5a) ha rivelato un incremento significativo nella potenza del segnale in risposta alla presentazione dello stimolo (0 s) nella condizione TMR. Questo incremento ha interessato un ampio spettro di frequenze ($\sim 1-25$ Hz), con un esordio a ~ 200 ms dalla presentazione dello stimolo e una durata superiore ai 1000 ms ($q < 0.001$, FDR-corrected). In particolare, è stato osservato un incremento nelle bande di frequenza delta (0.5-4 Hz), theta (4-8 Hz) e, in parte, alfa (8-12 Hz) nell'intervallo temporale tra ~ 200 ms e ~ 850 ms. Inoltre, a partire da ~ 850 ms dopo la presentazione dello stimolo, si registra un aumento nello spettro relativo agli *spindles* veloci (12-16 Hz). Nessuna differenza statisticamente significativa è emersa dall'analisi TF tra le condizioni *Remembered* e *Not Remembered* ($q < 0.001$, FDR-corrected) (Figura 3.5b).

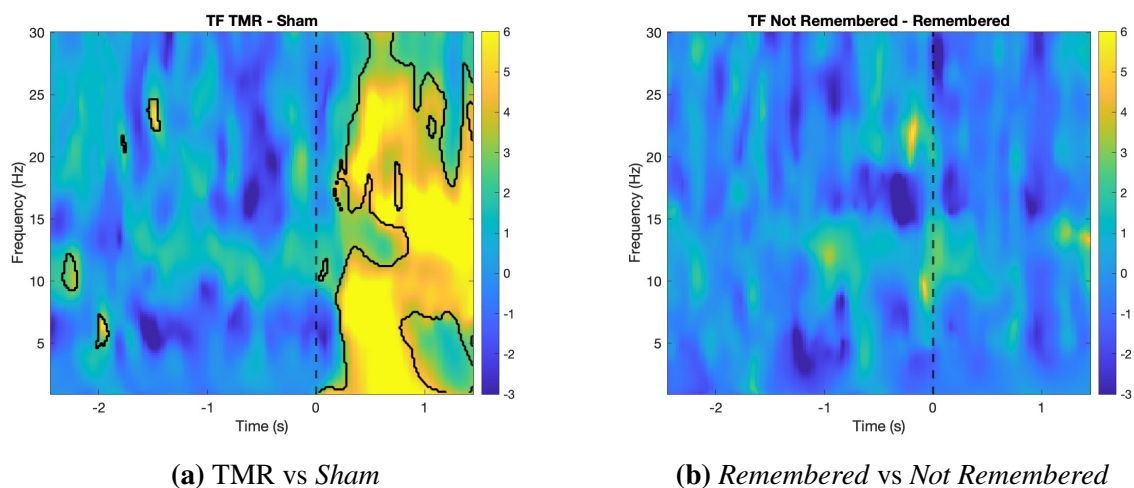


Figura 3.5: (a) Rappresentazione tempo-frequenza (TF) per la condizione TMR vs *Sham* e (b) per la condizione *Remembered* vs *Not Remembered*. La linea tratteggiata rappresenta l'inizio dello stimolo ($t = 0$). Le zone delineate in nero rappresentano le regioni in cui la stimolazione TMR ha prodotto un aumento o una diminuzione significativa della potenza EEG rispetto alla condizione *Sham* ($q < 0.001$, FDR-corrected)

3.4 Discussione e Conclusioni

Il presente studio è stato condotto con l'obiettivo di valutare l'efficacia della stimolazione acustica durante il sonno, somministrata in ambiente domestico tramite la fascia EEG ZMax. La stimolazione è stata effettuata secondo il paradigma *Closed-loop Targeted Memory Reactivation* (CL-TMR), con particolare attenzione alla modulazione dei correlati elettrofisiologici (EEG) del sonno a onde lente (SWS), in particolare delle oscillazioni lente (SO) e degli *sleep spindles*. Alla luce dei risultati di Debellemanni et al. (2018), che hanno evidenziato le potenzialità della stimolazione acustica in *closed-loop* anche in contesti domestici, e del recente studio di Salfi et al. (2025) che ha provato ad impiegare tale stimolazione secondo il paradigma CL-TMR, il presente studio si è proposto di verificare se la presentazione di pseudoparole, sincronizzate con l'*up-state* delle onde lente, fosse in grado di replicare, in un contesto ecologico, gli effetti osservati in precedenti studi di laboratorio condotti con lo stesso paradigma (Göldi et al., 2019; Ngo & Staresina, 2022; Shimizu et al., 2018).

A tal fine, è stato utilizzato un compito di apprendimento associativo (WPAL), progettato per creare un legame diretto tra specifici *cue* acustici (pseudoparole) e tracce mnestiche *target* (parole in italiano), facilitando la riattivazione selettiva di alcune memorie. Trattandosi di un compito legato alla memoria dichiarativa, ovvero a contenuti fortemente ippocampo-dipendenti, esso risulta particolarmente indicato per lo studio dei meccanismi di consolidamento sistemico, che si ritiene siano promossi dall'accoppiamento tra onde lente, *spindles* e *ripples* durante il sonno a onde lente (Staresina, 2024).

Sulla base di queste premesse, la prima ipotesi dello studio consisteva nel testare se la stimolazione acustica, sincronizzata con l'*up-state* delle onde lente, producesse un aumento sia dell'ampiezza sia della potenza delle oscillazioni lente, accompagnato da un incremento della potenza nella banda di frequenza degli *spindles*.

I risultati dell'analisi ERP, tuttavia, non mostrano differenze significative tra la risposta evocata in condizione di stimolazione TMR e quella osservata in assenza di stimolazione (*Sham*). Sebbene la soglia di significatività dopo correzione per confronti multipli non sia stata raggiunta, si osserva una chiara tendenza coerente con quanto riportato in studi precedenti: nella condizione TMR, sembra essere evocata un'ulteriore onda lenta in risposta alla stimolazione, con un primo picco negativo intorno ai ~640 ms e un secondo picco positivo a ~1250 ms.

Inoltre, i risultati significativi emersi dall'analisi TF tra la condizione *Sham* e la condizione TMR supportano ulteriormente questa ipotesi. L'analisi ha evidenziato un incremento significativo della potenza nelle bande di frequenza delta (0.5–4 Hz) e theta (4–8 Hz), a partire da ~200 ms dopo la presentazione dello stimolo. A partire da ~850 ms, è stato inoltre osservato un aumento nella banda compresa tra 12 e 16 Hz, coerente con l'attività degli *sleep spindles*.

Infine, la latenza temporale di ~650 ms tra l'aumento della potenza nelle bande delta/theta e quello osservato nella banda degli *spindles* suggerisce che tali eventi non siano episodi isolati, ma verosimilmente *spindles* accoppiati alle onde lente evocate dalla stimolazione. Questa dinamica risulta coerente con il processo di accoppiamento delle onde che caratterizza il consolidamento di sistema (Staresina, 2024).

Una possibile spiegazione della mancata significatività nell'analisi ERP può essere ricondotta all'elevata variabilità della risposta evocata agli stimoli TMR, osservabile sia tra soggetti diversi sia all'interno dello stesso individuo. Tale eterogeneità, chiaramente evidenziata dalla ampiezza della deviazione standard (illustrata dall'area sfumata nella Figura 3.4a), potrebbe aver compromesso la potenza statistica, limitando così la possibilità di rilevare effetti significativi. È opportuno sottolineare che i risultati non corretti mostrano una differenza significativa tra le due condizioni, suggerendo che i risultati finora ottenuti potrebbero essere attribuiti più alla limitata numerosità campionaria che a una reale assenza dell'effetto della stimolazione. In accordo con queste considerazioni, Lustenberger et al. (2022) hanno evidenziato come la risposta alla stimolazione acustica durante il sonno presenti una marcata variabilità, sia intersoggettiva sia intrasoggettiva. Tra le diverse variabili esaminate, l'attività a onde lente di base, registrata prima della stimolazione, si configura come il miglior predittore della risposta individuale. Questo parametro appare quindi cruciale in futuri tentativi di personalizzazione dei protocolli di stimolazione.

Un ulteriore elemento da considerare è la possibile discrepanza tra il momento effettivo della stimolazione e la fase ottimale delle onde lente. Sebbene gli stimoli TMR (della durata di 500 ms) fossero stati programmati per essere erogati durante l'*up-state* delle onde lente,

considerato il momento ottimale per la stimolazione (Göldi et al., 2019; Ngo & Staresina, 2022), la loro lunghezza, di gran lunga superiore a quella del *pink noise* standard (50 ms), unita alla ridotta accuratezza della fascia ZMax rispetto alla polisonnografia (a causa della qualità inferiore del segnale, della latenza del sistema, dei tempi di elaborazione...) potrebbero aver determinato l'erogazione di un numero consistente di stimolazioni in fasi sub-ottimali, come i *down-state*. Di conseguenza, l'efficacia della stimolazione potrebbe essere risultata attenuata rispetto all'effetto atteso.

Un aspetto metodologico aggiuntivo riguarda non solo la lunghezza, ma anche la complessità degli stimoli TMR impiegati. A differenza di altri studi (Shimizu et al., 2018; Wang et al., 2022), che hanno utilizzato stimoli acustici semplici (come suoni ambientali o sillabe), o dello studio di Göldi et al. (2019), che ha impiegato parole in olandese, il presente lavoro ha utilizzato pseudoparole, caratterizzate da una maggiore complessità semantica. Questa scelta potrebbe aver elicitato risposte corticali più complesse e meno standardizzate rispetto a quelle evidenziabili negli studi precedenti. In linea con questa ipotesi, l'analisi TF ha evidenziato un aumento significativo della potenza anche in bande di frequenza superiori rispetto a quella degli *spindles* (> 16 Hz, beta-gamma), nell'intervallo temporale compreso tra ~300 ms e ~1000 ms. Questo pattern potrebbe riflettere una condizione di "sovrastimolazione" corticale, indicativa di una risposta di *arousal* o attivazione potenzialmente eccessiva, non ottimale per una sincronizzazione efficace dell'accoppiamento tra onde lente (SO), *spindles* e *ripples* (Staresina, 2024).

Per quanto riguarda la seconda ipotesi, di natura esplorativa, è stata analizzata la possibile differenza nei correlati EEG legati agli stimoli *cue* associati a parole *Remembered* (ricordate) rispetto a quelle *Not Remembered* (non ricordate). L'obiettivo era verificare se l'elaborazione corticale degli stimoli *cue* potesse essere influenzata dalla presenza di tracce mnestiche già consolidate.

Tuttavia, né l'analisi degli ERP né quella TF hanno evidenziato differenze significative tra le due condizioni.

In uno studio precedente che ha utilizzato un paradigma TMR applicato a un compito di apprendimento associativo (Schreiner & Rasch, 2015), sono state osservate differenze nelle risposte ERP tra le condizioni *gain* (parole non ricordate prima del sonno ma recuperate al mattino) e *loss* (parole ricordate prima del sonno ma dimenticate al mattino). In particolare, il successo comportamentale della stimolazione TMR (condizione *gain*) è stato associato a una negatività frontale tardiva negli ERP (800–1100 ms), a un aumento dell'incidenza di onde lente frontali e a un incremento della potenza nella banda theta (5–7 Hz), localizzato nelle aree frontali e parietali. Queste categorie (*gain* e *loss*) permettono di confrontare direttamente la risposta EEG in relazione all'efficacia del *cueing*, basandosi sulla variazione comportamentale osservata tra pre-sonno e post-sonno, e quindi di isolare gli effetti EEG specifici del consolidamento

facilitato dalla stimolazione.

Al contrario, nel nostro studio l'analisi si è basata su una distinzione più generale tra parole *Remembered* e *Not Remembered*, definita sulla performance registrata nella prima sessione (T0) e mantenuta fissa per tutte le notti successive. Questa classificazione riflette la differenza tra tracce mnestiche già consolidate correttamente e tracce non ancora apprese, ma non consente di valutare direttamente se la stimolazione abbia modificato il processo di consolidamento di ciascuna traccia. Questa differenza metodologica potrebbe spiegare l'assenza di effetti significativi nelle analisi ERP e TF. Probabilmente, con una dimensione campionaria maggiore, sarà in futuro possibile utilizzare esclusivamente le risposte evocate durante la prima notte di stimolazione per valutare gli effetti della stimolazione sui due tipi di parole, limitando così eventuali interferenze dovute al riapprendimento delle stesse nelle sessioni successive.

Oltre ai limiti specifici già discussi, è importante sottolineare ulteriori criticità metodologiche. Innanzitutto, come già menzionato, la ridotta numerosità del campione compromette in modo significativo la potenza statistica dell'analisi, limitando di conseguenza la possibilità di generalizzare i risultati a una popolazione più ampia. Inoltre, la composizione del campione, formata esclusivamente da giovani adulti, riduce ulteriormente la validità esterna dello studio, rendendo difficile l'applicazione dei risultati a popolazioni con caratteristiche demografiche differenti.

Sebbene uno degli obiettivi del presente studio fosse proprio valutare l'efficacia del paradigma CL-TMR in un contesto domestico, è importante considerare che questo *setting* introduce numerose variabili non controllabili, come il limitato controllo sui partecipanti, la presenza di rumori e altri fattori di disturbo esterni, oltre alla possibile scarsa qualità del montaggio EEG. Inoltre, la fascia EEG ZMax utilizza solo due canali frontali (Fpz e F8), il che limita in modo significativo sia l'analisi degli eventi microstrutturali, sia la possibilità di effettuare una mappatura spaziale accurata di tali eventi.

Per concludere, nonostante i limiti metodologici discussi, i risultati ottenuti suggeriscono che la stimolazione acustica secondo il paradigma CL-TMR possa risultare efficace nel modulare l'attività a onde lente e nel favorire l'accoppiamento tra oscillazioni lente e *spindles*, un meccanismo cruciale nel consolidamento delle memorie dichiarative. Sebbene si tratti di evidenze preliminari, esse confermano quanto osservato in precedenti studi condotti in ambienti controllati (Göldi et al., 2019; Ngo & Staresina, 2022; Shimizu et al., 2018), aprendo così nuove prospettive per l'applicazione della stimolazione CL-TMR in contesti ecologici.

Alla luce di ciò, appare auspicabile un ulteriore perfezionamento sia dei protocolli di stimolazione sia degli algoritmi per la rilevazione dell'attività a onde lente, anche mediante l'utilizzo di dispositivi con un numero maggiore di canali, così da migliorare la rilevazione e l'analisi degli eventi microstrutturali del sonno. In prospettiva, sarà inoltre importante ampliare la numerosità campionaria e includere popolazioni cliniche, al fine di esplorare più a fondo le

potenzialità applicative del paradigma CL-TMR in ambito clinico (si veda Esfahani et al., 2023 per una descrizione dettagliata dei protocolli e degli algoritmi di rilevazione, nonché per una panoramica dei risultati con implicazioni cliniche ottenuti mediante stimolazioni acustiche in *closed-loop*).

In sintesi, la stimolazione acustica secondo il paradigma CL-TMR rappresenta una tecnica ancora relativamente recente, ma promettente per approfondire la relazione tra sonno, memoria e i correlati EEG coinvolti nel processo di consolidamento mnestico. Spetterà a studi futuri approfondire ulteriormente i meccanismi neurofisiologici sottostanti e delineare con maggiore precisione l'efficacia della stimolazione secondo il paradigma CL-TMR, anche in vista di potenziali applicazioni cliniche.

Bibliografia

- Kryger, M. H., Roth, T., & Dement, W. C. (2017). *Principles and Practice of Sleep Medicine* (6th). Elsevier.
- Andrillon, T., & Kouider, S. (2020). The vigilant sleeper: Neural mechanisms of sensory (de)coupling during sleep. *Current Opinion in Physiology*, *15*, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.12.002>
- Ficca, G., & Fabbri, M. (2019). *Psicologia del Sonno*. Maggioli Editore.
- Fagioli, I., & Salzarulo, P. (1995). Psicologia e fisiologia del sonno. In S. Sirigatti (Cur.), *Manuale di Psicologia Generale* (pp. 97–154). UTET.
- Borbély, A. A. (1982). A Two Process Model of Sleep Regulation. *Hum Neurobiol*, *1*(3), 195–204.
- Borbély, A. A., Daan, S., Wirz-Justice, A., & Deboer, T. (2016). The two-process model of sleep regulation: A reappraisal. *Journal of Sleep Research*, *25*(2), 131–143. <https://doi.org/10.1111/jsr.12371>
- Siegel, J. M. (2009). Sleep Viewed as a State of Adaptive Inactivity. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(10), 747–753. <https://doi.org/10.1038/nrn2697>
- Cirelli, C., & Tononi, G. (2008). Is Sleep Essential? *PLoS Biology*, *6*(8), e216. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060216>
- Rechtschaffen, A., & Bergmann, B. M. (2002). Sleep Deprivation in the Rat: An Update of the 1989 Paper. *Sleep*, *25*(1), 18–24. <https://doi.org/10.1093/sleep/25.1.18>
- Rasch, B., & Born, J. (2013). About Sleep's Role in Memory. *Physiological Reviews*, *93*(2), 681–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2012>
- Fuller, P. M., Gooley, J. J., & Saper, C. B. (2006). Neurobiology of the Sleep-Wake Cycle: Sleep Architecture, Circadian Regulation, and Regulatory Feedback. *Journal of Biological Rhythms*, *21*(6), 482–493. <https://doi.org/10.1177/0748730406294627>
- Chokroverty, S. (2010). Overview of sleep & sleep disorders. *Indian Journal of Medical Research*, *131*(2), 126.
- Feinberg, I., Fein, G., & Floyd, T. (1980). EEG patterns during and following extended sleep in young adults. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *50*(5–6), 467–476. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(80\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0013-4694(80)90013-9)
- Colten, H. R., & Altevogt, B. M. (2006). Sleep physiology. In H. R. Colten (Cur.), *Sleep disorders and sleep deprivation*. National Academies Press (US).
- AASM; Iber. (2007). *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events*. American Academy of Sleep Medicine.
- Rechtschaffen, A., & Kales, A. (Cur.). (1968). *A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring System of Sleep Stages in Human Subjects*. Brain Information Service/Brain Research Institute, University of California.

- Carskadon, M., & Dement, W. C. (2005). Normal Human Sleep: An Overview. In M. H. Kryger, T. Roth & W. C. Dement (Cur.), *Principles and Practice of Sleep Medicine* (pp. 16–26). Elsevier.
- Klinzing, J. G., Niethard, N., & Born, J. (2019). Mechanisms of systems memory consolidation during sleep. *Nature Neuroscience*, 22(10), 1598–1610. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0467-3>
- Staresina, B. P. (2024). Coupled sleep rhythms for memory consolidation. *Trends in Cognitive Sciences*, 28(4), 339–351. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2024.02.002>
- Diekelmann, S., & Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(2), 114–126. <https://doi.org/10.1038/nrn2762>
- Staresina, B. P., Bergmann, T. O., Bonnefond, M., van der Meij, R., Jensen, O., Deuker, L., Elger, C. E., Axmacher, N., & Fell, J. (2015). Hierarchical Nesting of Slow Oscillations, Spindles and Ripples in the Human Hippocampus during Sleep. *Nature Neuroscience*, 18(11), 1679–1686. <https://doi.org/10.1038/nn.4119>
- Cash, S. S., Halgren, E., Dehghani, N., Rossetti, A. O., Thesen, T., Wang, C., Devinsky, O., Kuzniecky, R., Doyle, W., Madsen, J. R., Bromfield, E., Erőss, L., Halász, P., Karmos, G., Csercsa, R., Wittner, L., & Ulbert, I. (2009). The Human K-Complex Represents an Isolated Cortical Down-State. *Science*, 324(5930), 1084–1087. <https://doi.org/10.1126/science.1169626>
- Amzica, F., & Steriade, M. (2002). The functional significance of K-complexes. *Sleep Medicine Reviews*, 6(2), 139–149. <https://doi.org/10.1053/smr.2001.0181>
- Diba, K., & Buzsáki, G. (2007). Forward and reverse hippocampal place-cell sequences during ripples. *Nature Neuroscience*, 10(10), 1241–1242. <https://doi.org/10.1038/nn1961>
- Adamantidis, A. R., Gutierrez Herrera, C., & Gent, T. C. (2019). Oscillating circuitries in the sleeping brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(12), 746–762. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0223-4>
- Nolen-Hoeksema, S., Fredrickson, B., Loftus, G. R., & Lutz, C. (2014). *Atkinson & Hilgard's Introduction to Psychology* (16^a ed.). Cengage Learning.
- Girardeau, G., & Lopes-dos-Santos, V. (2021). Brain neural patterns and the memory function of sleep. *Science*, 374(6567), 560–564. <https://doi.org/10.1126/science.abi8370>
- Jenkins, J. G., & Dallenbach, K. M. (1924). Obliviscence during Sleep and Waking. *The American Journal of Psychology*, 35(4), 605–612. <https://doi.org/10.2307/1414040>
- Benson, K., & Feinberg, I. (1977). The Beneficial Effect of Sleep in an Extended Jenkins and Dallenbach Paradigm. *Psychophysiology*, 14(4), 375–384. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.1977.tb02967.x>

- Ellenbogen, J. M., Payne, J. D., & Stickgold, R. (2006). The role of sleep in declarative memory consolidation: Passive, permissive, active or none? *Current Opinion in Neurobiology*, *16*(6), 716–722. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.10.006>
- Born, J., & Wilhelm, I. (2012). System consolidation of memory during sleep. *Psychological Research*, *76*(2), 192–203. <https://doi.org/10.1007/s00426-011-0335-6>
- Born, J., Rasch, B., & Gais, S. (2006). Sleep to Remember. *The Neuroscientist*, *12*(5), 410–424. <https://doi.org/10.1177/1073858406292647>
- Yuksel, C., Denis, D., Coleman, J., Ren, B., Oh, A., Cox, R., Morgan, A., Sato, E., & Stickgold, R. (2025). Both slow wave and rapid eye movement sleep contribute to emotional memory consolidation. *Communications Biology*, *8*(1), 485. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07868-5>
- Davidson, P., Jönsson, P., Carlsson, I., & Pace-Schott, E. (2021). Does Sleep Selectively Strengthen Certain Memories Over Others Based on Emotion and Perceived Future Relevance? *Nature and Science of Sleep, Volume 13*, 1257–1306. <https://doi.org/10.2147/NSS.S286701>
- Marshall, L., & Born, J. (2007). The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends in Cognitive Sciences*, *11*(10), 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2007.09.001>
- Marr, D. (1971). Simple Memory: A Theory for Archicortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *262*(841), 23–81. <https://doi.org/10.1098/rstb.1971.0078>
- Brodth, S., Inostroza, M., Niethard, N., & Born, J. (2023). Sleep—A brain-state serving systems memory consolidation. *Neuron*, *111*(7), 1050–1075. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.03.005>
- Sawangjit, A., Harkotte, M., Oyanedel, C. N., Niethard, N., Born, J., & Inostroza, M. (2022). Two distinct ways to form long-term object recognition memory during sleep and wakefulness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(34), e2203165119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2203165119>
- Rasch, B., Büchel, C., Gais, S., & Born, J. (2007). Odor Cues During Slow-Wave Sleep Prompt Declarative Memory Consolidation. *Science*, *315*(5817), 1426–1429. <https://doi.org/10.1126/science.1138581>
- Maingret, N., Girardeau, G., Todorova, R., Goutierre, M., & Zugaro, M. (2016). Hippocampocortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nature Neuroscience*, *19*(7), 959–964. <https://doi.org/10.1038/nn.4304>
- Ladenbauer, J., Ladenbauer, J., Külzow, N., De Boor, R., Avramova, E., Grittner, U., & Flöel, A. (2017). Promoting Sleep Oscillations and Their Functional Coupling by Transcranial Stimulation Enhances Memory Consolidation in Mild Cognitive Impairment. *The Jour-*

- nal of Neuroscience*, 37(30), 7111–7124. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0260-17.2017>
- Geva-Sagiv, M., Mankin, E. A., Eliashiv, D., Epstein, S., Cherry, N., Kalender, G., Tchemodanov, N., Nir, Y., & Fried, I. (2023). Augmenting hippocampal–prefrontal neuronal synchrony during sleep enhances memory consolidation in humans. *Nature Neuroscience*, 26(6), 1100–1110. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01324-5>
- Davis, H., Davis, P. A., Loomis, A. L., Harvey, E. N., & Hobart, G. (1939). ELECTRICAL REACTIONS OF THE HUMAN BRAIN TO AUDITORY STIMULATION DURING SLEEP. *Journal of Neurophysiology*, 2(6), 500–514. <https://doi.org/10.1152/jn.1939.2.6.500>
- Goel, N., Kim, H., & Lao, R. P. (2005). An Olfactory Stimulus Modifies Nighttime Sleep in Young Men and Women. *Chronobiology International*, 22(5), 889–904. <https://doi.org/10.1080/07420520500263276>
- Cellini, N., & Mednick, S. C. (2019). Stimulating the sleeping brain: Current approaches to modulating memory-related sleep physiology. *Journal of Neuroscience Methods*, 316, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.11.011>
- Rihm, J. S., Diekelmann, S., Born, J., & Rasch, B. (2014). Reactivating Memories during Sleep by Odors: Odor Specificity and Associated Changes in Sleep Oscillations. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 26(8), 1806–1818. https://doi.org/10.1162/jocn_a_00579
- Cellini, N., & Capuozzo, A. (2018). Shaping memory consolidation via targeted memory reactivation during sleep. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1426(1), 52–71. <https://doi.org/10.1111/nyas.13855>
- Carbone, J., & Diekelmann, S. (2024). An update on recent advances in targeted memory reactivation during sleep. *npj Science of Learning*, 9(1), 31. <https://doi.org/10.1038/s41539-024-00244-8>
- Schreiner, T., & Rasch, B. (2015). Boosting Vocabulary Learning by Verbal Cueing During Sleep. *Cerebral Cortex*, 25(11), 4169–4179. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu139>
- Rakowska, M., Abdellahi, M. E., Bagrowska, P., Navarrete, M., & Lewis, P. A. (2021). Long term effects of cueing procedural memory reactivation during NREM sleep. *NeuroImage*, 244, 118573. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.118573>
- Xia, T., Yao, Z., Guo, X., Liu, J., Chen, D., Liu, Q., Paller, K. A., & Hu, X. (2023). Updating memories of unwanted emotions during human sleep. *Current Biology*, 33(2), 309–320.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.12.004>
- Esfahani, M. J., Farboud, S., Ngo, H.-V. V., Schneider, J., Weber, F. D., Talamini, L. M., & Dresler, M. (2023). Closed-loop auditory stimulation of sleep slow oscillations: Basic principles and best practices. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 153, 105379. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105379>

- Debellemanière, E., Pinaud, C., Schneider, J., Arnal, P. J., Casson, A. J., Chennaoui, M., Galtier, M., Navarrete, M., & Lewis, P. A. (2022). Optimising sounds for the driving of sleep oscillations by closed-loop auditory stimulation. *Journal of Sleep Research*, *31*(6), e13676. <https://doi.org/10.1111/jsr.13676>
- Ngo, H.-V. V., Martinetz, T., Born, J., & Mölle, M. (2013). Auditory Closed-Loop Stimulation of the Sleep Slow Oscillation Enhances Memory. *Neuron*, *78*(3), 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.006>
- Ngo, H.-V. V., Miedema, A., Faude, I., Martinetz, T., Mölle, M., & Born, J. (2015). Driving Sleep Slow Oscillations by Auditory Closed-Loop Stimulation—A Self-Limiting Process. *The Journal of Neuroscience*, *35*(17), 6630–6638. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3133-14.2015>
- Santostasi, G., Malkani, R., Riedner, B., Bellesi, M., Tononi, G., Paller, K. A., & Zee, P. C. (2016). Phase-locked loop for precisely timed acoustic stimulation during sleep. *Journal of Neuroscience Methods*, *259*, 101–114. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.11.007>
- Ong, J. L., Lo, J. C., Chee, N. I., Santostasi, G., Paller, K. A., Zee, P. C., & Chee, M. W. (2016). Effects of phase-locked acoustic stimulation during a nap on EEG spectra and declarative memory consolidation. *Sleep Medicine*, *20*, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2015.10.016>
- Papalambros, N. A., Santostasi, G., Malkani, R. G., Braun, R., Weintraub, S., Paller, K. A., & Zee, P. C. (2017). Acoustic Enhancement of Sleep Slow Oscillations and Concomitant Memory Improvement in Older Adults. *Frontiers in Human Neuroscience*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00109>
- Debellemanière, E., Chambon, S., Pinaud, C., Thorey, V., Dehaene, D., Léger, D., Chennaoui, M., Arnal, P. J., & Galtier, M. N. (2018). Performance of an Ambulatory Dry-EEG Device for Auditory Closed-Loop Stimulation of Sleep Slow Oscillations in the Home Environment. *Frontiers in Human Neuroscience*, *12*, 88. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00088>
- Cox, R., Hofman, W. F., De Boer, M., & Talamini, L. M. (2014a). Local sleep spindle modulations in relation to specific memory cues. *NeuroImage*, *99*, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.05.028>
- Arnal, P. J., Thorey, V., Debellemanière, E., Ballard, M. E., Bou Hernandez, A., Guillot, A., Jourde, H., Harris, M., Guillard, M., Van Beers, P., Chennaoui, M., & Sauvet, F. (2020). The Dreem Headband compared to polysomnography for electroencephalographic signal acquisition and sleep staging. *Sleep*, *43*(11), zsaa097. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsaa097>

- Schneider, J., Lewis, P. A., Koester, D., Born, J., & Ngo, H.-V. V. (2020). Susceptibility to auditory closed-loop stimulation of sleep slow oscillations changes with age. *Sleep*, *43*(12), zsaal11. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsaal11>
- Harrington, M. O., Ngo, H.-V. V., & Cairney, S. A. (2021). No benefit of auditory closed-loop stimulation on memory for semantically-incongruent associations. *Neurobiology of Learning and Memory*, *183*, 107482. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107482>
- Koo-Poeggel, P., Neuwerk, S., Petersen, E., Grasshoff, J., Mölle, M., Martinetz, T., & Marshall, L. (2022). Closed-loop acoustic stimulation during an afternoon nap to modulate subsequent encoding. *Journal of Sleep Research*, *31*(6), e13734. <https://doi.org/10.1111/jsr.13734>
- Göldi, M., van Poppel, E. A. M., Rasch, B., & Schreiner, T. (2019). Increased neuronal signatures of targeted memory reactivation during slow-wave up states. *Scientific Reports*, *9*(1), 2715. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39178-2>
- Ngo, H.-V. V., & Staresina, B. P. (2022). Shaping Overnight Consolidation via Slow-Oscillation Closed-Loop Targeted Memory Reactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(44), e2123428119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2123428119>
- Shimizu, R. E., Connolly, P. M., Cellini, N., Armstrong, D. M., Hernandez, L. T., Estrada, R., Aguilar, M., Weisend, M. P., Mednick, S. C., & Simons, S. B. (2018). Closed-Loop Targeted Memory Reactivation during Sleep Improves Spatial Navigation. *Frontiers in Human Neuroscience*, *12*, 28. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00028>
- Abdellahi, M. E. A., Koopman, A. C. M., Treder, M. S., & Lewis, P. A. (2023). Targeting Targeted Memory Reactivation: Characteristics of Cued Reactivation in Sleep. *NeuroImage*, *266*, 119820. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119820>
- Wang, J.-Y., Heck, K. L., Born, J., Ngo, H.-V. V., & Diekelmann, S. (2022). No difference between slow oscillation up- and down-state cueing for memory consolidation during sleep. *Journal of Sleep Research*, *31*(6), e13562. <https://doi.org/10.1111/jsr.13562>
- Hu, X., Cheng, L. Y., Chiu, M. H., & Paller, K. A. (2020). Promoting memory consolidation during sleep: A meta-analysis of targeted memory reactivation. *Psychological Bulletin*, *146*(3), 218–244. <https://doi.org/10.1037/bul0000223>
- Batterink, L. J., Creery, J. D., & Paller, K. A. (2016). Phase of Spontaneous Slow Oscillations during Sleep Influences Memory-Related Processing of Auditory Cues. *The Journal of Neuroscience*, *36*(4), 1401–1409. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3175-15.2016>
- Cox, R., Korjoukov, I., Boer, M. de, & Talamini, L. M. (2014b). Sound Asleep: Processing and Retention of Slow Oscillation Phase-Targeted Stimuli. *PLOS ONE*, *9*(7), e101567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101567>
- Buysse, D. J., Reynolds, C. F., Monk, T. H., Berman, S. R., & Kupfer, D. J. (1989). The Pittsburgh Sleep Quality Index: A New Instrument for Psychiatric Practice and Research. *Psychiatry Research*, *28*(2), 193–213. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(89\)90047-4](https://doi.org/10.1016/0165-1781(89)90047-4)

- Curcio, G., Tempesta, D., Scarlata, S., Marzano, C., Moroni, F., Rossini, P. M., Ferrara, M., & De Gennaro, L. (2013). Validity of the Italian Version of the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI). *Neurological Sciences, 34*(4), 511–519. <https://doi.org/10.1007/s10072-012-1085-y>
- Morin, C. M., Belleville, G., Bélanger, L., & Ivers, H. (2011). The Insomnia Severity Index: Psychometric Indicators to Detect Insomnia Cases and Evaluate Treatment Response. *Sleep, 34*(5), 601–608. <https://doi.org/10.1093/sleep/34.5.601>
- Castronovo, V., Galbiati, A., Marelli, S., Brombin, C., Cugnata, F., Giarolli, L., Anelli, M. M., Rinaldi, F., & Ferini-Strambi, L. (2016). Validation study of the Italian version of the Insomnia Severity Index (ISI). *Neurological Sciences, 37*(9), 1517–1524. <https://doi.org/10.1007/s10072-016-2620-z>
- Johns, M. W. (1991). A New Method for Measuring Daytime Sleepiness: The Epworth Sleepiness Scale. *Sleep, 14*(6), 540–545. <https://doi.org/10.1093/sleep/14.6.540>
- Vignatelli, L., Plazzi, G., Barbato, A., Ferini-Strambi, L., Manni, R., Pompei, F., D'Alessandro, R., & on behalf of GINSEN. (2003). Italian version of the Epworth sleepiness scale: External validity. *Neurological Sciences, 23*(6), 295–300. <https://doi.org/10.1007/s100720300004>
- Natale, V., Esposito, M. J., Martoni, M., & Fabbri, M. (2006). Validity of the reduced version of the Morningness-Eveningness Questionnaire. *Sleep and Biological Rhythms, 4*(1), 72–74. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8425.2006.00192.x>
- Lovibond, P., & Lovibond, S. (1995). The structure of negative emotional states: Comparison of the Depression Anxiety Stress Scales (DASS) with the Beck Depression and Anxiety Inventories. *Behaviour Research and Therapy, 33*(3), 335–343. [https://doi.org/10.1016/0005-7967\(94\)00075-U](https://doi.org/10.1016/0005-7967(94)00075-U)
- Bottesi, G., Ghisi, M., Altoè, G., Conforti, E., Melli, G., & Sica, C. (2015). The Italian Version of the Depression Anxiety Stress Scales-21: Factor Structure and Psychometric Properties on Community and Clinical Samples. *Comprehensive Psychiatry, 60*, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2015.04.005>
- Troyer, A. K., & Rich, J. B. (2002). Psychometric Properties of a New Metamemory Questionnaire for Older Adults. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences, 57*(1), P19–P27. <https://doi.org/10.1093/geronb/57.1.P19>
- Raimo, S., Trojano, L., Siciliano, M., Cuoco, S., D'Iorio, A., Santangelo, F., Abbamonte, L., Grossi, D., & Santangelo, G. (2016). Psychometric properties of the Italian version of the multifactorial memory questionnaire for adults and the elderly. *Neurological Sciences, 37*(5), 681–691. <https://doi.org/10.1007/s10072-016-2562-5>
- Salvi, F., D'Atri, A., Arnone, B., Corigliano, D., Amicucci, G., Viselli, L., Naccarato, F., Festucci, F., Tempesta, D., & Ferrara, M. (2025). Promoting vocabulary learning during sleep

- at home using closed-loop targeted memory reactivation. *Journal of Sleep Research*, e70000. <https://doi.org/10.1111/jsr.70000>
- Peirce, J., Gray, J. R., Simpson, S., MacAskill, M., Höchenberger, R., Sogo, H., Kastman, E., & Lindeløv, J. K. (2019). PsychoPy2: Experiments in behavior made easy. *Behavior Research Methods*, *51*(1), 195–203. <https://doi.org/10.3758/s13428-018-01193-y>
- Keuleers, E., & Brysbaert, M. (2010). Wuggy: A multilingual pseudoword generator. *Behavior Research Methods*, *42*(3), 627–633. <https://doi.org/10.3758/BRM.42.3.627>
- Loh, S., Lamond, N., Dorrian, J., Roach, G., & Dawson, D. (2004). The validity of psychomotor vigilance tasks of less than 10-minute duration. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, *36*(2), 339–346. <https://doi.org/10.3758/BF03195580>
- Åkerstedt, T., & Gillberg, M. (1990). Subjective and Objective Sleepiness in the Active Individual. *International Journal of Neuroscience*, *52*(1–2), 29–37. <https://doi.org/10.3109/00207459008994241>
- Stanyer, E. C., Baniqued, P. D. E., Awais, M., Kouara, L., Davies, A. G., Killan, E. C., & Mushtaq, F. (2022). The impact of acoustic stimulation during sleep on memory and sleep architecture: A meta-analysis. *Journal of Sleep Research*, *31*(3), e13385. <https://doi.org/10.1111/jsr.13385>
- Delorme, A., & Makeig, S. (2004). EEGLAB: An open source toolbox for analysis of single-trial EEG dynamics including independent component analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, *134*(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2003.10.009>
- Maris, E., & Oostenveld, R. (2007). Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *Journal of Neuroscience Methods*, *164*(1), 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.03.024>
- Oostenveld, R., Fries, P., Maris, E., & Schoffelen, J.-M. (2011). FieldTrip: Open Source Software for Advanced Analysis of MEG, EEG, and Invasive Electrophysiological Data. *Computational Intelligence and Neuroscience*, *2011*(1), 156869. <https://doi.org/10.1155/2011/156869>
- Lustenberger, C., Ferster, M. L., Huwiler, S., Brogli, L., Werth, E., Huber, R., & Karlen, W. (2022). Auditory deep sleep stimulation in older adults at home: A randomized crossover trial. *Communications Medicine*, *2*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s43856-022-00096-6>