

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de ciências biológicas

Programa de pós-graduação em Neurociências

Alan Patrick Silva Gusmão

Estudo dos efeitos da exposição única à cocaína sobre o acoplamento oscilatório em circuitos hipocampo-corticais, arquitetura do sono e memória em ratos

Fevereiro de 2020

Belo Horizonte – MG

Alan Patrick Silva Gusmão

Estudo dos efeitos da exposição única à cocaína sobre o acoplamento oscilatório em circuitos hipocampo-corticais, arquitetura do sono e memória em ratos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar

Fevereiro de 2020
Belo Horizonte – MG

043

Gusmão, Alan Patrick Silva.

Estudo dos efeitos da exposição única à cocaína sobre o acoplamento oscilatório em circuitos hipocampo-corticais, arquitetura do sono e memória em ratos [manuscrito] / Alan Patrick Silva Gusmão. – 2020.

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

Orientador: Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociência. 2. Cocaína. 3. Sono. 4. Córtex Pré-Frontal. 5. Hipocampo. 6. Eletrofisiologia. 7. Memória. I. Aguiar, Cleiton Lopes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências. Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

Estudo dos efeitos da exposição única à cocaína sobre o acoplamento oscilatório em circuitos hipocampo-corticais, arquitetura do sono e memória em ratos

ALAN PATRICK SILVA GUSMÃO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS CLÍNICAS.

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Cleiton Lopes Aguiar - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Flávio Afonso Gonçalves Mourão
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Rafael Naime Ruggiero
Universidade de São Paulo

Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a todos os animais que doaram suas vidas por esse projeto científico.

Ao Prof. Dr. Cleiton Lopes-Aguiar por acreditar no meu potencial, por me aceitar em seu grupo de pesquisa e confiar em mim. Obrigado por todo o aprendizado, e por você acreditar em uma ciência aberta, acessível e por estar sempre atento a aprender e a ouvir com os seus alunos, eu aprendi muito a fazer ciência e a pensar sobre o mundo, esse trabalho não existiria sem seu apoio, horas extras, e todo a sua paixão pela ciência, obrigado por tudo.

A Ikaro Beraldo pela generosidade e humildade, por toda a dedicação em me ajudar com esse trabalho, sem você isso não seria possível, muito obrigado meu amigo.

Agradeço aos meus pais Alberto e Ildete pela dedicação a minha formação e a minha educação, e por acreditarem sempre em mim, independentemente de qualquer circunstância. Sem vocês esse trabalho também não existiria.

Aos meus irmãos por toda a amizade, carinho e amor.

À minha segunda mãe Marilene por todo o cuidado durante minha formação.

À minha tia-avó Ducarmo por todo o amor incondicional e zelo por mim.

Aos meus amigos que me apoiaram todo esse tempo.

A Gabriel e a Vanuza pelo amor e amizade.

A André por seu amor e suporte.

A amizade de Rafael, e por me ouvir sempre que estive desanimado.

Além disso agradeço a todos do núcleo de Neurociências (NNC), aos amigos que fiz, aos professores e colegas que me ensinaram como fazer ciência com tanto profissionalismo, mesmo sem verbas e com o sucateamento da pesquisa no Brasil.

A professora Dra. Grace e a Dra. Giselle que me acolheram na minha primeira visita ao NNC.

Ao Prof. Dr. Fabricio Moreira por acreditar no meu trabalho e pela colaboração na realização da pesquisa.

A Dr. Laila por todo apoio, e paciência entre idas e vinda ao laboratório para pesar drogas, e realizar procedimentos, seu sorriso tornou o caminho mais feliz.

Ao professor Dr. Vinicius Ribas, pelo apoio e por me ensinar a respeitar os animais, e ser muito atento aos detalhes técnicos.

A professora Ms. Patrícia e ao professor Dr. Bernardo pelas cartas de recomendação para o processo seletivo do mestrado.

A Rafaela e Lis, por se tornarem minhas companheiras de cirurgias e registro e procedimentos, que ocorriam entre feriados e fins de semana, vou sentir muita saudade de tudo isso.

A Jéssica pela ajuda preciosa com a análise da tarefa de reconhecimento e por sua generosidade e alegria.

A Xicão, Renan, Mateus Prates, Mateus Ruas, Igor e Bruno, que dividiram o fazer científico e me ensinaram muito sobre muitas coisas.

A Aron Swartz que dedicou sua vida como ativista e acreditou que a ciência deveria ser de todos.

A Alexandra Elbakyan que acredita numa desburocratização do acesso ao que é produzido em ciência.

E a todos que acreditam nos movimentos de ciência aberta, biohacker, e qualquer movimento que mexa em estruturas cristalizadas de poder, principalmente nos tempos sombrios como esses que estamos vivendo nesse país.

*“ah si visse solo di inizi
di eccitazioni da prima volta
quando tutto ti sorprende e
nulla ti appartiene ancora*

*penseresti all'odore di un libro nuovo
a quello di vernice fresca
a un regalo da scartare
al giorno prima della festa.”*

(Niccolo Fabi)

Lista de abreviaturas

AP	Ântero-Posterior
CA1	Cornu Ammonis 1
DV	Dorso-ventral
GABA	Ácido gama-amino butírico
GD	Giro Denteado
i.p.	Intraperitoneal
LFP	Potencial Local de Campo (<i>Local Field Potential</i>)
LTD	Depressão de Longa Duração (<i>Long-term Depression</i>)
LTP	Potenciação de Longa Duração (<i>Long-term Potentiation</i>)
ML	Meso-lateral
mPFC	Córtex Pré-Frontal Medial
NAcc	Núcleo accumbens
NREM	Sem movimento rápido dos olhos (<i>Non-rapid eye movement</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFC	Córtex Pré-Frontal
q.s.p	Quantidade suficiente para (em Latim, Quantum Satis para)
REM	Movimento rápido dos olhos (<i>Rapid eye movement</i>)
SWS	Sono de ondas lentas (<i>Slow-wave sleep</i>)
VTa	Área tegmental ventral
MLO	Tarefa de memória de localização de objetos
COCA-2,5	Cocaína 2,5 mg/kg
COCA-15	Cocaína 15 mg/kg
CDF	Distribuição cumulativa empírica
MI	Cálculo do índice de modulação
aWK	Épocas de vigília

RMS

Valores quadráticos médios

Resumo

A cocaína, uma droga com grande potencial de abuso, gera alterações persistentes em redes responsáveis pelo processamento de recompensa e memória, tais como córtex pré-frontal medial (mPFC), área tegmentar ventral, hipocampo, *nucleus accumbens*, entre outras, podendo levar à dependência. Os efeitos induzidos por cocaína durante o sono podem ser peças fundamentais para compreender como traços de memória relacionados ao uso dessa substância se estabelecem de forma duradoura em redes corticais associativas. Nosso estudo testou se uma exposição única à cocaína é capaz de afetar persistentemente padrões oscilatórios e a coordenação entre CA1 e mPFC durante o sono. Além disso, testamos se tais alterações eletrofisiológicas são: (1) dependentes da dose utilizada e (2) associadas a prejuízos de consolidação de memória. Ratos Wistar adultos foram implantados cronicamente com eletrodos no mPFC e região de CA1 do hipocampo para registros de potenciais de campo locais. Uma semana depois, os animais foram submetidos a habituação à caixa de registro e, no dia seguinte, à sessão de registro (dia 1). No dia 2, os animais foram treinados em tarefa de memória de localização de objetos (MLO) e, em seguida, receberam injeção sistêmica de salina 0,9% (SAL), cocaína 2,5 mg/kg (COCA-2,5) ou cocaína 15 mg/kg (COCA-15), sendo registrados em seguida. No terceiro dia, os animais foram submetidos ao teste de MLO e a registros eletrofisiológicos. Nossos resultados indicam que tanto o grupo COCA-2,5 quanto o COCA-15 apresentaram um aumento da latência para início do sono. Durante o estado acordado, observamos um aumento da coerência entre CA1 e mPFC na banda de frequência teta (7-9 Hz) na comparação entre os grupos COCA-15 e SAL. Surpreendentemente, o acoplamento entre fase de teta e amplitude de gamma rápida (100-140 Hz) em CA1 diminuiu durante as primeiras três horas pós-COCA-15. Após este efeito inicial, observamos um aumento da potência em delta (1-4 Hz) tanto em CA1 quanto no mPFC durante sono de ondas lentas em ambos os grupos tratados com COCA (2,5 e 15) em comparação ao grupo SAL. Tal efeito rebote foi associado a aumento na incidência de eventos de ripples hipocampais (140-220 Hz) apenas no grupo COCA-15. O tratamento com COCA-2,5 foi capaz de induzir aumento da potência em delta apenas no mPFC, mas não em CA1, sugerindo que estas regiões são moduladas de forma diferencial durante um estado de hiperdopaminergia. Apesar da diversidade dos efeitos reportados, todos os parâmetros avaliados voltaram ao estado de linha de base 24 h após o tratamento. Por fim, não observamos efeitos significativos induzidos por COCA sobre a consolidação de memória em tarefa MLO. Em conclusão, nosso estudo demonstrou que a cocaína é capaz de afetar padrões oscilatórios e a coordenação entre CA1 e mPFC de forma dose-dependente e transitória sem afetar a formação de memórias relacionadas a localização de objetos.

Palavras-Chaves: Cocaína, Sono, Oscilações, Córtex, Hipocampo, Eletrofisiologia in vivo, Memória

Abstract

Cocaine, a drug with high potential for abuse, can produce persistent changes in networks responsible for reward and memory processing, such as medial prefrontal cortex (mPFC), ventral tegmental area, hippocampus, nucleus accumbens, among others, which can lead to addiction. The effects induced by cocaine during sleep can be fundamental to understand how memory traces related to the use of this substance are established in a lasting way in associative cortical networks. Our study tested whether a single exposure to cocaine is able to persistently affect oscillatory patterns and coordination between CA1 and mPFC during sleep. In addition, we tested whether such electrophysiological changes are: (1) dose-dependent and (2) associated with impaired memory consolidation. Adult Wistar male rats were chronically implanted with electrodes in the mPFC and CA1 subfield of the hippocampus for extracellular records of local field potentials. One week later, the animals were habituated to the recording chamber and, on the following day, to the first recording session (day 1). On day 2, immediately after the training session in the task of object-location memory task (OLM), animals received a systemic injection of 0.9% saline (SAL), cocaine 2.5 mg/kg (COCA-2.5) or cocaine 15 mg/kg (COCA-15), and underwent to a recording session. On the third day, the animals were submitted to the OLM test and electrophysiological records. Both the COCA-2.5 and COCA-15 groups showed increased latency for sleep onset. During the awake state, we observed an increase in coherence between CA1 and mPFC in the theta frequency band (7-9 Hz) when comparing the COCA-15 and SAL groups. Surprisingly, the theta-phase - fast gamma amplitude (100-140 Hz) coupling in CA1 decreased during the first three hours after COCA-15. After this initial effect, we observed an increase in delta power (1-4 Hz) in both CA1 and mPFC during slow-wave sleep in both groups treated with COCA (2.5 and 15) compared to the SAL group. This rebound effect was associated with an increase in the incidence of hippocampal ripple events (140-220 Hz) only in the COCA-15 group. Treatment with COCA-2.5 was able to induce an increase in delta power only in mPFC, but not in CA1, suggesting that these regions are differentially modulated by hyperdopaminergic state. Despite the diversity of reported effects, all parameters evaluated in this study returned to baseline conditions 24 h after treatment. Finally, we did not see any significant effects induced by COCA on memory consolidation in OLM task. In conclusion, our study demonstrated that cocaine is able to affect oscillatory patterns and the coordination of hippocampal-cortical networks in a dose-dependent and transitory manner without affecting the formation of object location memories.

SUMÁRIO:

1.INTRODUÇÃO	15
1.1 A RELAÇÃO DOS SERES HUMANOS COM AS DROGAS	15
1.2 COCAÍNA	16
1.3 MECANISMOS DE AÇÃO DA COCAÍNA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	17
1.3.1 A CONEXÃO ANATÔMICA ENTRE mPFC e CA1	22
1.4 COCAÍNA E SONO	22
1.5 PADRÕES OSCILATÓRIOS E COCAÍNA	24
1.6 HIPÓTESE DO AJUSTE HOMEOSTÁTICO SINÁPTICO	25
2. OBJETIVOS GERAIS	27
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 SUJEITOS	28
4.2 DROGAS	28
4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA DE IMPLANTE DE ELETRODOS	28
4.4 APARATO EXPERIMENTAL	30
4.5 LESÃO ELETROLÍTICA, PERFUSÃO E FIXAÇÃO DO TECIDO NERVOSO	30
4.6 HISTOLOGIA	31
4.7 DESENHO EXPERIMENTAL	31
4.8 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETO	34
5. PRÉ-PROCESSAMENTO	35
5.1 CÁLCULO DA DENSIDADE ESPECTRAL DE POTÊNCIA, RMS DO EMG E INTEGRAÇÃO DE POTÊNCIA DE BANDAS	35
5.2 CLASSIFICAÇÃO DOS ESTÁGIOS DO CICLO SONO-VIGÍLIA	36
5.3 ARQUITETURA DO SONO	37
5.4 LATÊNCIA PARA SONO	37
5.5 DENSIDADE ESPECTRAL DE POTÊNCIA	37
	13

5.6 ESPECTROGRAMAS	38
5.7 COERÊNCIA MULTI-TAPER	38
5.8 ACOPLAMENTO DE FREQUÊNCIA CRUZADA	39
5.9 DETECÇÃO DE RIPPLES	40
6. RESULTADOS	43
6.1 CONFIRMAÇÃO HISTOLÓGICA DO POSICIONAMENTO DOS ELETRODOS	43
6.2 VALIDAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DE ESTADOS COMPORTAMENTAIS DURANTE SONO-VIGÍLIA	45
6.3 DINÂMICA OSCILATÓRIA E COERÊNCIA DE AMPLITUDE ENTRE CA1 E MPFC DURANTE O SONO NORMAL	50
6.4 EFEITOS DE DIFERENTES DOSES DE COCAÍNA SOBRE O CICLO SONO-VIGÍLIA	51
6.5 EFEITOS DA COCAÍNA SOBRE A COERÊNCIA DE AMPLITUDE ENTRE CA1 E MPFC	55
6.6 ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR COCAÍNA NO ACOPLAMENTO TETA-GAMA E TETA-HFO DO HIPOCAMPO	57
6.7 EFEITO REBOTE DE ONDAS DELTA E INCIDÊNCIA DE RIPPLES DURANTE SONO NREM SUBSEQUENTE AO TRATAMENTO COM COCAÍNA	60
6.9 EFEITOS DA COCAÍNA SOBRE A MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS	66
7. DISCUSSÃO	68
7.2 ACOPLAMENTO FASE-AMPLITUDE ENTRE TETA E GAMA HIPOCAMPAL	70
7.3 EFEITO REBOTE DE ONDAS DELTA E INCIDÊNCIA RIPPLES HIPOCAMPALIS	71
7.4 OSCILAÇÕES GAMA	72
7.5 RECONHECIMENTO DA LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS E SUA RELAÇÃO COM O ACOPLAMENTO EM TETA	72
7.6 CONCLUSÕES E DIREÇÕES FUTURAS	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
9. ANEXO	88

1.INTRODUÇÃO

1.1 A RELAÇÃO DOS SERES HUMANOS COM AS DROGAS

Desde a antiguidade as plantas são utilizadas para a extração de compostos. Elas já faziam parte da vida dos ancestrais humanos, que viviam como caçadores-coletores, já que esses grupos, em suas viagens, coletavam informações consideráveis sobre as plantas para sua utilização em sua rotina, usando as plantas para diversos fins (CROCQ, 2007). Ötzi, o homem que teve o corpo encontrado nos Alpes em 1991, e que viveu há cerca de 3.300 anos AC, carregava consigo algumas plantas que utilizava para fins farmacológicos diversos (CROCQ, 2007), e só então o contato humano com os psicoativos, foi surgir provavelmente, logo após a adoção de um estilo de vida de pastoreio, quando os seres humanos começaram a ampliar e sistematizar o uso das plantas, e a modificar sua relação com a natureza (CROCQ, 2007). Isso atesta que o uso e a relação dos seres humanos com essas substâncias, é tão antigo quanto os indícios sobre a própria humanidade.

Porém ao longo do tempo, a história mostrou que o contato com essas substâncias foi sendo moldado por vários fatores, incluindo alguns fatores como a cultura e a sociedade, a religião e as crenças, a personalidade aditiva do indivíduo, a cognição, neurobiologia e a genética (CROCQ, 2007). Essa relação persiste nos dias atuais, já que o contato com essas substâncias é muito importante e presente no dia a dia dos seres humanos.

Alguns destes aspectos categorizaram uma certa quantidade de substâncias encontradas em plantas ou substâncias sintéticas em um grupo específico, e essas características, deram origem ao termo “droga”, termo usado popularmente, e que a Organização Mundial da Saúde (OMS) (1993, 69-82), define como sendo "toda substância natural ou sintética que introduzida no organismo vivo, pode modificar uma ou mais de suas funções”, e a legislação brasileira por sua vez, define o termo como sendo “as substâncias ou produtos capazes de causar dependência” (PROJETO DE LEI 7.663/10).

Por esse motivo as drogas na sociedade começaram a ser reguladas, devido ao seu poder de abuso, e devido às suas consequências na saúde do indivíduo. Essas consequências, que são geradas pelo uso das drogas, se expandem para o campo social e econômico, e os impactos do uso de tais substâncias, permanecem presentes na sociedade, mesmo após essas regulações, já que mesmo ilegalmente, as drogas continuaram a tecer impactos na sociedade ao longo da história.

Apesar disso, hoje se discute se as drogas ilícitas, não liberadas para comercialização, deveriam ser vistas mais como um problema de saúde pública, do que um problema criminal. A

OMS em seus relatórios sobre drogas e criminalização, afirma que aspectos de saúde pública merecem ser privilegiados nessa problemática (UNODC, 2019).

Portanto, é possível afirmar que o uso das drogas afeta a sociedade e a economia, de tal maneira, que o seu consumo deva ser analisado primeiramente em impactos individuais, e a partir daí, órgãos responsáveis poderiam desenhar análises referentes aos impactos coletivos, isso porque, os danos à saúde do usuário, ainda estão sendo elucidados, mostrando que a pesquisa e refinamento dos dados são necessários para as políticas públicas eficientes (UNODC, 2019).

Mesmo assim as consequências adversas do uso das drogas, já sugerem que os impactos para a saúde pública, são mais severos e generalizados do que se se havia estimado previamente, como afirma o último relatório das Nações Unidas (UNODC, 2019).

Ao todo, esses dados mostram que cerca de 35 milhões de pessoas apresentam uma condição de abuso de drogas em todo o mundo, e esses números crescem a cada ano (UNODC, 2019). Além disso, apesar dos dados serem alarmantes, há ainda uma ineficiência na recuperação de usuários, já que por ano, apenas 1 em cada 7 usuários passam por tratamento devido aos danos causados pelo uso de drogas como afirma o relatório mundial de drogas de 2019 (UNODC, 2019).

O investimento em pesquisa portanto, tende a ser uma ferramenta valiosa para o melhor entendimento de como as drogas atuam nos processos fisiológicos, esclarecendo o funcionamento dessas substâncias no organismo do usuário, para que governantes e organizações possam propor soluções baseadas em evidências científicas. Essas propostas devem ser baseadas em prevenção e controle de impactos, já que os números expressivos mostram um crescimento anual do consumo, reflexo dos danos causados primeiramente ao indivíduo.

1.2 COCAÍNA

Uma das drogas que recebe destaque nos dados da Organização mundial da Saúde (OMS), é a cocaína, que sempre foi categorizada como uma das drogas mais utilizadas no mundo, e no estudo realizado em 2018, mostrou que seu uso atingiu níveis recordes globais em toda a história de consumo (UNODC, 2019).

A cocaína, é um alcalóide derivado da folha da *Erythroxylon Coca*, e está presente em cerca de 1% da folha de coca. Há relatos de que pessoas que vivem nos Andes mastigam as folhas dessa planta há pelos menos 1.200 anos (DACKIS et al, 2001); (NATHANSON et al., 1993), o que mostra que a curiosidade pelos efeitos da planta pelos seres humanos, é antigo.

Dentre os países citados no estudo da OMS, que abrange todos os continentes, o Brasil é o segundo colocado entre os que mais consomem a cocaína. Esses números são maiores caso sejam incluídos a utilização de seus derivados, como o uso do *Crack*, *Oxi* ou *merla* (UNODC, 2015). Os dados preocupam as autoridades, mas há pouca efetividade nas políticas brasileiras atuais contra o consumo.

Os efeitos deletérios da planta foram registrados pela primeira vez por conquistadores espanhóis, que descobriram que usuários habituais da planta se tornavam letárgicos quando privados do seu uso, além disso a igreja no período da colonização das américas, distribuía folhas de coca com o propósito de melhorar a produtividade de índios escravizados (EARLEY, 1991). A cocaína, então séculos mais tarde, foi isolada e identificada, mais precisamente em 1850, logo após, foi utilizada para diversos fins, e prescrita inclusive como anestésico para dor de dente infantil, e usada para tratamentos de depressão e alcoolismo.

A história da droga e do seu consumo, mostra que o seu uso foi popularizado ao longo dos anos, e inicialmente, ela até foi categorizada como uma opção segura para usos recreativos, e inclusive sendo usada massivamente, depois passando por um período em que foi banida, como nos Estados Unidos em 1914. Porém, ainda em 1970 a cocaína voltou a ser vista como prática de estatus social, presente em festas e eventos, logo após o declínio do uso das anfetaminas (DACKIS et al., 2001).

1.3 MECANISMOS DE AÇÃO DA COCAÍNA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O uso da cocaína amplifica a neurotransmissão dopaminérgica através do bloqueio da recaptação neuronal pré-sináptica de monoaminas, especialmente a dopamina. De fato, estudos anteriores demonstraram que lesões na inervação dopaminérgica da área tegmental ventral (ATV) foram suficientes para interromper comportamentos relacionados a dependência (BRADBERRY, 2002). A maior parte da dopamina do cérebro é sintetizada na ATV e na substância negra, que primariamente projeta para o corpo estriado- estriado ventral e estriado dorsal (IKEMOTO, 2010). As projeções da ATV são um dos componentes do feixe do prosencéfalo medial, que são responsáveis pelo circuito de recompensa (YOU, CHEN, WISE., 2001; IKEMOTO, 2010).

A cocaína atua nas conexões no circuito encefálico envolvidas no processo de recompensa e aprendizado, com intensidade maior do que os reforçadores naturais, tais como o consumo de comida e água, hábitos de socialização e sexo (SCHULTZ et al., 1997). Esses processos de

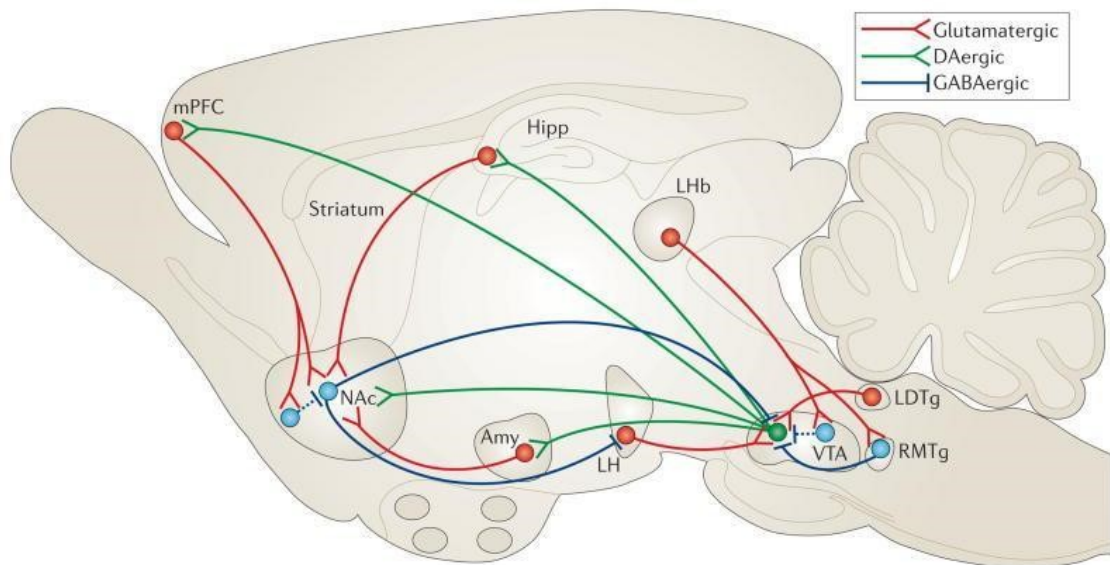
aprendizagem normalmente modulam os comportamentos, e o bloqueio ou interrupção desses processos, baseados no bloqueio de recompensas, ou na disponibilidade de recompensa, tendem a enfraquecer ou a fortalecer esses comportamentos (SCHULTZ et al., 1997).

SCHULTZ et al., 1997 mostrou que o sistema dopaminérgico pode influenciar precisamente nesses comportamentos, estando presente em diversas funções cognitivas, e funções ligadas à sobrevivência, que também dependem dessas funções do sistema dopaminérgico.

Por exemplo, a super estimulação de circuitos, que também são relacionados a hábitos de sobrevivência, pela cocaína, pode levar a mudanças comportamentais duradouras, e essas mudanças podem alterar a plasticidade sináptica do ATV, culminando posteriormente na dependência da droga (MILLS et al., 2017; NESTLER, 2005).

Essas alterações modulam as respostas ligadas a estímulos que geram a sensação de prazer nos seres humanos e animais em condições naturais. Essas alterações ocorrem, de maneira particular no núcleo accumbens (NAcc), nessa região essas células normalmente são responsáveis pela sensação de bem estar em condições naturais, essas alterações foram descritas, por exemplo, em organismos mais simples, como moscas, mostrando quão importante é o circuito dopaminérgico para a sobrevivência dos seres ao longo da evolução (NESTLER., 2001; NESTLER, 2005).

A figura 1 ilustra o circuito de recompensa em roedores. A cocaína atua nas terminações axonais das projeções dopaminérgicas provindas da ATV, que são enviadas ao córtex pré-frontal (CPF), NAcc, amígdala e hipocampo (NESTLER, 2005) (**figura 1: linhas verdes**).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1. Esquema simplificado do circuito de recompensa em roedores. A natureza das aferências e eferências de ATV e NAc estão ilustradas com cores distintas. Em verde, estão representadas as projeções dopaminérgicas. Em azul, estão representadas as projeções GABAérgicas. Em vermelho, estão representadas as projeções glutamatérgicas. (RUSSO & NESTLER, 2013).

Como visto na figura anterior, o sistema dopaminérgico também está conectado a sistemas de memória como amígdala e hipocampo. Essas conexões responsáveis pela memória, atuam em conjunto com a sensação de prazer vinda do NAcc, que por fim fortalece as memórias, que são associadas a sensação de prazer experienciada por usuários, que após o uso constante tornam-se dependentes da substância, repetindo os estímulos motivados pelo prazer encontrado no uso (NESTLER, 2005).

Porém a dinâmica temporal dos efeitos da cocaína, varia de acordo com a dose. Alguns dos trabalhos mostraram alterações diversas baseadas em um modelo dose-dependente. Como pode ser visto, a figura 2 mostra as diferenças de duas dosagens de cocaína, as doses de 15 mg/kg e 1 mg/kg em relação a concentração de cocaína no plasma (Figura 2.A), no cérebro (Figura 2.B) e especificamente no NAcc (Figura 2.C). A injeção sistêmica de cocaína 15 mg/kg produziu um aumento mais sustentado, e essa alteração de maior intensidade e duração, provavelmente facilitará a consolidação do hábito de compulsão pela droga, que acontece após o uso contínuo, de doses como as de 15mg/kg (BRADBERRY., 2002).

Ainda de acordo com a figura também podemos observar que a concentração extracelular no cérebro pela dosagem de 15mg/kg é maior e permanece por mais tempo na região extracelular (BRADBERRY, 2002).

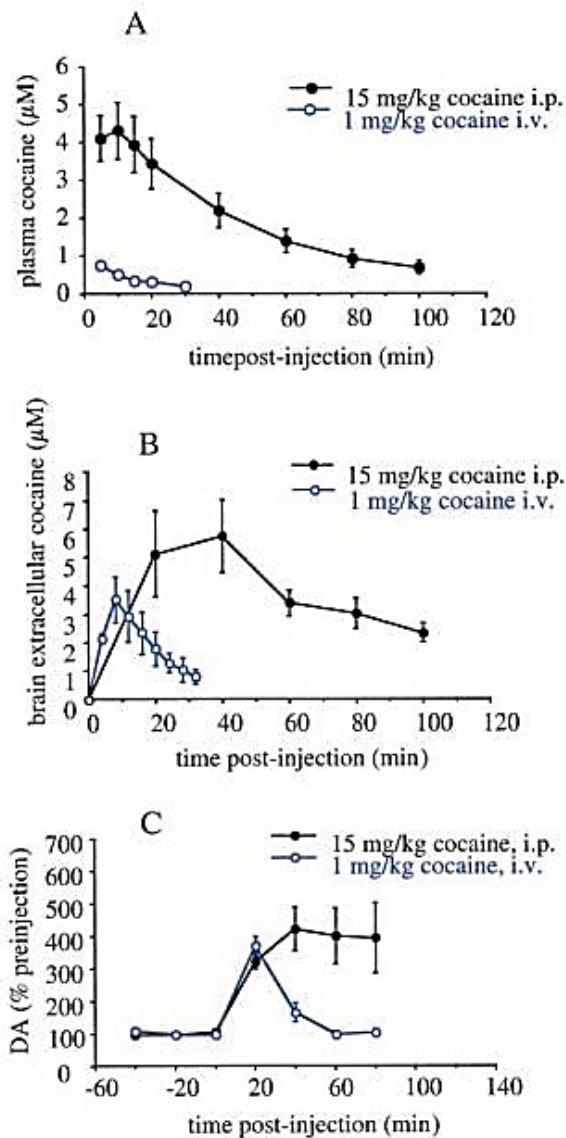


Figura 2. (BRADBERRY, 2002). (a) Níveis de cocaína no plasma sanguíneo com administrações intraperitoneais de 15 mg/kg e de 1 mg/kg via intravenosa; (b) medição por micro diálise da concentração cerebral extracelular estimada de cocaína; (c) impacto da cocaína por duas vias diferentes na dopamina extracelular no núcleo Accumbens.

A dopamina, como já estabelecido na literatura, tem um papel importante em processos de aprendizagem e memória (BERKE, 2018). As alterações de aprendizagem e memória induzidas por cocaína podem ser observadas mesmo em experimentos utilizando doses únicas. Em macacos, por exemplo, a administração aguda alterou o aprendizado reverso. Esse tipo de paradigma experimental, propõe a inibição do estímulo de recompensa aprendido pelo animal, que uma vez condicionado em função de uma resposta de recompensa, passa pelo treinamento com o objetivo

de inibir o processo adquirido. Apesar do estudo ter apresentado essa alteração, ele mostra que seria necessário um tratamento crônico, para déficits de longa duração (JENTSCH, et al., 2002).

Apesar de apenas o tratamento crônico, apresentar déficits de longa duração, outros trabalhos demonstraram a importância das alterações em uma dosagem aguda, já que nesses termos, essa dose seria o suficiente para alterar o aprendizado, além de induzir a sensibilização do comportamento contexto-dependente, uma vez que a cocaína, mesmo em dose única induziria as transformações, e o processo de recompensa, favorecendo a consolidação memórias ligadas ao contexto do uso da cocaína nesse estágio (EVANS, WENGER., 1992; SARTI et al., 2007).

Então, os processos mnemônicos parecem ser importantes no estabelecimento da dependência da cocaína. Por exemplo, no chamado comportamento de retomada do uso após a abstinência, há alterações importantes nos mecanismos de memória. Esses mecanismos atuam tanto no processo de consolidação quando no possível enfraquecimento da memória, envolvendo a via ATV- NAcc e a via ATV-hipocampo, mostrando que a ATV participa desses processos e pode ser um alvo no tratamento de usuários (CASTILLO DÍAZ et al., 2019).

Outros aspectos importantes são os efeitos no córtex frontal. Pacientes em recuperação de dependência química, apresentam persistentes reduções na atividade metabólica do córtex pré-frontal, do córtex orbitofrontal e do giro cingulado anterior (VOLKOW & FOWLER, 2000), e também redução da densidade neural dos lobos frontais (FRANKLIN, CHILDRESS, O'BRIEN, MCELGIN, & RAGLAND, 2001). Essas alterações podem estar envolvidas no processo de negação da droga, comportamento comum em usuários de drogas, e pode se relacionar com o fato do córtex frontal está ligado na supressão de impulsos, o que caracteriza também a rapidez com a qual, a dependência é estabelecida (DACKIS et al., 2001).

Há uma hipótese, porém, que diz que enquanto a dose aguda da cocaína causa o aumento da atividade locomotora, o uso crônico aumenta progressivamente e de maneira duradoura o efeito de locomoção causado pela droga, sendo frequentemente chamado de sensibilização comportamental, esse feito é determinado através da seleção de neurônios do NAcc, determinando quais serão subsequentemente ativados através da cocaína (MATTSON ET AL., 2008).

A cocaína também afeta as aferências glutamatérgicas, que carregam informações específicas sobre o meio ambiente do córtex para o estriado, e ativa específicas populações de neurônios estriatais que são esparsamente distribuídas, isso pode contribuir para o processamento da memória. (MATTSON, et al., 2008; PENNARTZ et al., 1994; O'DONNELL, 2003).

Portanto, a cocaína parece afetar memória e funções frontais por meio de alterações persistentes modificando de maneira seletiva alterações em redes responsáveis pelo processamento de recompensa e de memória, tais como mPFC, ATV hipocampo e NAcc. Tais alterações representam aspectos essenciais dos mecanismos responsáveis pelo abuso da cocaína.

Entretanto, a forma como a cocaína altera a conectividade entre as regiões citadas ainda é pouco compreendida, apesar disso alguns estudos mostraram como a conectividade é alterada em doses crônicas da droga, um estudo em especial, apresentou dados sobre os impactos nos arranjos de interações nodais, principalmente em regiões da amígdala, NAcc, subnúcleo talâmico, e córtices límbico e sensoriomotor (ORSINI, et al., 2018).

1.3.1 A CONEXÃO ANATÔMICA ENTRE mPFC e CA1

O hipocampo é dividido em subcamadas (CA1, CA2 e CA3) além do complexo subicular, incluindo o subiculum, que fica situado próximo a camada de CA1 (JAY & WITTER, 1991).

As projeções hipocampais que foram vistas através de um marcador retrógrado específico, mostraram uma conexão direta entre a região de CA1, o subiculum, e o córtex pré-frontal. Essas projeções são restritas a porções do córtex pré-frontal e originam-se de restritas partes do CA1, além de toda a extensão dorsoventral da região proximal do subiculum (JAY & WITTER, 1991)

A maior parte dos neurônios de CA1 que projetam o mPFC, exceto a parte dorsoventral do hipocampo que não está presente nessa projeção (JAY & WITTER, 1991).

1.4 COCAÍNA E SONO

As perturbações de sono são comumente associadas aos usuários de cocaína (KNAPP., et al, 2007). Além disso é possível notar também que similares perturbações ocorrem em algumas patologias. As pesquisas que exemplificam esses achados se baseiam na alteração da transmissão central dopaminérgica, como dito, esses trabalhos, têm demonstrado alterações na arquitetura do sono, e essas observações então, sugerem que a DA pode estar ligada a regulação do ciclo sono-vigília (ADLER, 2005; GAGNON et al., 2002; ABBOTT, 2005; MAGGINI et al., 1986; O'BRIEN et al., 2003).

Essas alterações que modificam a arquitetura do sono, ou constituição das fases do sono, e que regulam esse processo, são coordenadas por uma série de complexas interações que

sistematicamente modulam o disparo de neurônios dos sistemas colinérgicos (HOBSON ET AL., 1993), orexinérgico (LIN et al., 1999), noradrenérgico (ASTON-JONES AND BLOOM, 1981), histaminérgico (JOHN et al., 2004), e serotoninérgico (ESPANA AND SCAMMELL, 2004). Os neurônios desses sistemas enviam projeções eferentes para as estruturas corticais e subcorticais que geram padrões de atividade características do estado sono e vigília (DZIRASA et al., 2006).

Durante o estado acordado, o córtex apresenta oscilações rápidas de baixa amplitude em gama (33-55 Hz) e alta atividade muscular (STERIADE et al., 1993). Em seguida, após um período de sonolência, caracterizado por um estado de repouso, com alerta reduzido, ocorre a transição para sono de ondas lentas ou NREM (do inglês *non-rapid eye movement*). Neste estado, existe predominância de oscilações de alta amplitude e baixa frequência, e a atividade muscular diminui (STERIADE et al., 1993; HOBSON AND PACE-SCHOTT, 2002). Durante o estágio de *rapid-eye movement* (REM) ou sono paradoxal, o córtex e as estruturas subcorticais apresentam rápidas oscilações em gama, similares às do estado acordado e o hipocampo apresenta oscilações na frequência de (4 – 9 Hz), denominadas de ritmo teta (VANDERWOLF, 1969; TIMO-IARIA et al., 1970; CANTERO et al., 2003) (apud DZIRASA et al., 2006).

A cocaína é capaz de induzir um estado de alerta persistente e modular esse padrão do sono, alguns estudos mostraram que essa substância também afeta a estrutura das fases do ciclo-sono vigília de roedores (DUGOVIC et al., 1992; KNAPP et al., 2007), causando rebote de sono após administração aguda (DUGOVIC et al., 1992; KNAPP et al., 2007). Esse rebote de sono, é uma espécie de compensação, funcionando como um processo de equilíbrio para reestabelecer um estado basal importante do sistema biológico. Foi mostrado também que a cocaína aumenta de maneira dose-dependente a latência do sono REM e NREM e a duração de todo o sono, além de aumentar o tempo de vigília através do aumento da duração dos episódios de vigília. Além disso alguns trabalhos mostraram que a cocaína alterou a densidade espectral do EEG, e que essas alterações são representadas pela mudança nesses padrões dos estados de sono (BJORNESS, GREENE, 2018).

Há também outros trabalhos, por exemplo, que explicam que o uso de cocaína pode estar ligado a mudanças da expressão de genes do relógio moduladores do ciclo Circadiano, e que estes genes também estariam ligados a alterações do circuito de recompensa (WANG et al., 2019). Mas apesar dessas alterações descritas nesse trabalho sobre o efeito da cocaína no ciclo circadiano, as características de alterações no padrão do sono de usuários, e suas conexões ainda não estão claras (WANG et al., 2019).

Entretanto, alguns autores sustentam que mudanças no ciclo circadiano, induzidas por cocaína, poderiam aumentar a vulnerabilidade para o desenvolvimento de dependência, essa correlação é sugerida pelos pesquisadores, que observaram uma forte relação entre o comportamento aditivo com alterações no ciclo circadiano, e essas alterações também são sustentadas por hipóteses sobre específicos genes que regulam o ciclo, e os padrões de sono do indivíduo, apresentando uma forte correlação entre esses fatores (LOGAN, WILLIAMS, MCCLUNG, 2014).

1.5 PADRÕES OSCILATÓRIOS E COCAÍNA

Uma das maneiras de estudar a sincronicidade de circuitos locais e distantes no cérebro é registrando os potenciais locais de campo (*ou local field potentials*) (LFP) nas áreas de interesse. Os LFP são o somatório dos potenciais dendríticos excitatórios e inibitórios numa pequena região (aproximadamente 200-400 μm) ao redor da ponta do eletrodo. Ao contrário dos eletrodos de registros de *spikes* intra e extracelular que representam saídas neurais, os LFPs representam a somatória das entradas e o processamento local em um conjunto de neurônios

Ao analisar os LFPs de uma rede local, é possível observar os padrões oscilatórios, como por exemplo, as oscilações teta (6 - 12 Hz) e gama (25 - 100 Hz), essa faixa ou assinatura das oscilações varia um pouco de autor para autor, há por exemplo termos que diferenciam subtipos de oscilações como o que foi feito em trabalho de revisão, onde (BUZSÁKI & WANG, 2012) discutem os mecanismos e possíveis funções de três tipos de oscilações gama: a) gama lenta (30-50 Hz), b) gama intermediária (50-90 Hz) e, c) gama rápida (90 -140 Hz). Neste estudo os autores discutem o que podem ser consideradas os ritmos gama e essas caracterizações.

As oscilações são observadas sob escalas temporais e espaciais, algumas teorias sugerem que elas são responsáveis pela comunicação de células neurais. Para a caracterização desses fenômenos usamos a análise do espectral, que representam graficamente essas oscilações através de ferramentas matemáticas (COLE & VOYTEK, 2017).

Essa comparação é muito importante para compreender certos fenômenos e comportamentos, observados na comparação da assinatura dessas áreas, por exemplo, BENCHENANE et al. 2010 mostraram que as amplitudes de teta entre CA1 e mPFC em ratos, aumentavam de forma síncrona (chamada de coerência de amplitude em teta) durante tarefas de tomada de decisão e também por meio de infusão intra-cerebral de dopamina.

Alguns estudos demonstraram como a cocaína em dose única alterou a relação dessas assinaturas entre áreas, por exemplo, DILGEN, et al. 2013 demonstraram que a exposição aguda a cocaína em camundongos parece aumentar a sincronicidade de oscilações gama.

Como outro bom exemplo de utilidade do LFP neste campo de conhecimento, podemos citar o trabalho de HARRIS BOZER et al., 2016, que observaram um aumento concomitante de delta e teta na ATV após dose única de cocaína.

A alteração dos diferentes padrões oscilatórios, também frequentemente ocorre junto de mesmo padrão de uma das etapas do ciclo circadiano, e interagem entre si de forma local ou através de estruturas diferentes. A natureza da interação é geralmente hierárquica e universal, de modo que a fase da oscilação mais lenta modula a amplitude das mais rápidas (BUZSÁKI., LOGOTHETIS., SINGER, 2013). Isso ocorre com a magnitude das ondas gama que apresentam uma co-modulação com oscilações mais lentas, como o ritmo teta (BUZSÁKI., XIAO-JING, 2012).

Praticamente todas as redes oscilatórias são baseadas em um processo inibitório, e é desse processo inibitório que surgem esses diferentes padrões oscilatórios. (BUZSÁKI; WATSON, 2012). Enquanto as oscilações rápidas são associadas com mudanças pequenas em pequenas quantidades de células neurais locais, as oscilações lentas são associadas a grandes mudanças em muitos neurônios das redes cerebrais, o que é modificado quando o cérebro engaja em diferentes comportamentos e frequências específicas se tornam dominantes (BUZSÁKI., XIAO-JING, 2012).

O acoplamento de frequências cruzadas entre os ritmos lentos e as oscilações gama pode dar suporte a troca de informações entre regiões distantes do cérebro. É o que acontece, por exemplo, com o ritmo teta no hipocampo, que parece ser capaz de sincronizar oscilações gama locais em múltiplas áreas corticais (BUZSÁKI; XIAO-JING, 2012).

ZHU et al., 2019 demonstraram recentemente que o acoplamento entre teta e gama apresenta-se aumentado durante tarefa de PCL (preferência condicionada de lugar) induzida por heroína em ratos. Os autores argumentam que tais alterações poderiam estar subjacentes ao desenvolvimento de dependência em heroína. Entretanto, os efeitos da cocaína sobre acoplamento teta-gama no hipocampo e mPFC ainda não está descrito na literatura.

1.6 HIPÓTESE DO AJUSTE HOMEOSTÁTICO SINÁPTICO

A hipótese da homeostase sináptica (HHS) propõe que o sono é um processo essencial e necessário para manter a renormalização das sinapses, ou em outras palavras, o sono é um mecanismo de ajuste, que adequa os processos, normalizando os pesos sinápticos, uma vez que essas conexões precisam se reajustar para manter sua eficiência (ZENKE, GERSTNER, 2017; TONONI., CIRELLI, 2018).

A HSS preconiza que a redução dos pesos sinápticos ocorreria simultaneamente em regiões em que o processo de aprendizado não ocorre (TONONI., CIRELLI, 2018; TONONI, GIULIO AND CIRELLI, 2014). Essa redução dos pesos sinápticos, que tendem a preparar o cérebro para os processos seguintes, acontece durante o sono, como foi dito anteriormente, e já durante o estado de vigília, os neurônios possuem uma atividade restrita, devido ao alto gasto realizado em disparos e através da dispendiosa atividade sináptica (TONONI, CIRELLI, 2018). Além disso, os neurônios também enfrentam restritivas manobras de transferência de informações, já que estes recebem milhares de diferentes entradas, mas enviam praticamente um sinal binário. Por esses motivos os neurônios tendem a manter um baixo disparo em condições naturais, e a responderem a estímulos seletivos e importantes com um aumento, em vez de uma queda na atividade dos disparos (TONONI, CIRELLI., 2019).

A HSS sugere que novos e importantes eventos são provavelmente aprendidos através do fortalecimento das sinapses, mais do que pelo seu enfraquecimento (TONONI, CIRELLI, 2019). Esse fortalecimento sináptico devido ao aprendizado contínuo, cria a necessidade deste processo de renormalização sináptica, ou processo de homeostase. E, de fato, os cientistas já consideram essas hipóteses para entender como os circuitos neurais, lidam com o dilema da plasticidade e da estabilidade, para evitar a potenciação descontrolada e a saturação da capacidade do aprendizado, já que essas manobras tendem a um alto gasto energético, que podem ocasionar a degeneração celular, o que necessariamente torna o processo de HHS importante (TONONI, CIRELLI, 2019).

Identificar esses mecanismos de renormalização sináptica no sono é uma das questões mais importantes para o futuro, e ao longo dos anos dois pontos foram desenhados de acordo com todo o arcabouço teórico produzido até os dias atuais são eles: a) a atividade neural é importante para a diminuição específica, e b) a renormalização durante o sono parece poupar os neurônios e/ou sinapses mais ativas (TONONI, CIRELLI, 2019).

Sabe-se que os neurônios coativos durante o aprendizado estão mais propensos a disparar conjuntamente durante um sono NREM subsequente, e estes são protegidos dessa diminuição seletiva descrita pelos estudos, esses mesmos neurônios após o sono, mantêm ou aumentam a

atividade geral que tiveram após o aprendizado, apesar de não se saber o que acontece com as sinapses destes mesmos neurônios (TONONI, CIRELLI, 2019).

A natureza desse processo é abrangente e parece ser responsável por diversos efeitos a nível cognitivo, que vão desde a consolidação da memória até o seu próprio enfraquecimento (TONONI; CIRELLI, 2019).

Outros achados ainda mostram a importância do ciclo sono e vigília para o processo homeostático, sugerindo que as atividades que afetam as alterações homeostáticas nos circuitos neuronais são desencadeadas durante o sono NREM, mas são implementadas durante o sono REM, mostrando a necessidade da organização das etapas do ciclo sono vigília nessa normalização sináptica (MIYAWAKI, DIBA, 2016).

2. OBJETIVOS GERAIS

Nosso estudo testou se uma exposição única à cocaína é capaz de afetar persistentemente padrões oscilatórios e a coordenação entre CA1 e mPFC durante o sono. Além disso, testamos se tais alterações eletrofisiológicas são: (1) dependentes da dose utilizada e (2) associadas a prejuízos de consolidação de memória.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Testar os efeitos de COCA-2,5 (cocaína na dose 2,5 mg/kg) e COCA-15 (cocaína 15 mg/kg) sobre:

- 1- O tempo de vigília e estágios do sono;
- 2- A coerência de amplitude em teta entre CA1 e mPFC;
- 3- Padrões oscilatórios durante o sono, tais como oscilações delta, teta e gama;
- 4- A incidência de *ripples* hipocâmpais;
- 5- O acoplamento entre fase de teta e amplitude de gama na região CA1 do hipocampo durante estado acordado e de sono REM;
- 6- A consolidação de memória de localização de objetos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SUJEITOS

Foram utilizados 26 ratos Wistar adultos entre 250 e 380 g, provenientes do Biotério Central da Universidade de Minas Gerais – UFMG/Belo Horizonte, sendo que 18 animais foram aproveitados como sujeitos experimentais, e posteriormente 2 animais foram excluídos após as análises. Os outros 8 animais foram eutanasiados ou morreram durante os procedimentos cirúrgicos.

Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno (41 x 34 x 18 cm; 3 animais por caixa) no Biotério de Experimentação Exclusivo para Ratos do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, e todas essas caixas continham madeira raspada (serragem ou maravalha) sobre o assoalho. Os animais também receberam ração balanceada padrão e água “*ad libitum*”. Durante todo o período em que os experimentos ocorreram, esses animais ficaram alojados no biotério com temperatura controlada (22 °C) e submetidos a ciclo de 12h claro/escuro.

Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA: 41/2017)

4.2 DROGAS

Foram usadas xilazina (Cloridrato de xilazina a 2%, diluída em veículo q.s.p) e cetamina (Cloridrato cetamina a 10%, diluída veículo estéril q.s.p) para procedimentos de anestesia utilizados nos procedimentos cirúrgicos. As injeções foram aplicadas diretamente via intramuscular ou intraperitoneal. Além disso foi usada Lidocaína aplicada localmente, para anestesia.

A cocaína (Merck) foi diluída diretamente em salina (solução de NaCl a,15M), para dosagens de 15 mg/kg e 2.5 mg/kg (KNAPP., et al, 2007) injeções via i.p.

4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA DE IMPLANTE DE ELETRODOS

Inicialmente é calculado a dosagem de acordo com o peso do animal, sendo que 1 mL para cada kg do peso do animal que configura os 100%, em seguida é injetado a mistura de 0,7mL/kg de cetamina e 0,35mL/kg de xilazina (70% e 35% respectivamente) via intraperitoneal, ambas as

drogas vendidas diluídas. Após essa injeção é administrado uma dosagem de 0,5 de cetamina e 0,25 de xilazina (50% e 25% respectivamente) injetada por via intramuscular, esse foi o protocolo utilizado inicialmente, e por manter uma taxa alta de sucesso, na recuperação dos animais, esse protocolo foi mantido. Após a segunda dosagem é checado o efeito dos anestésicos através de pinçamento de cauda do animal, para que se note se há respostas. Em seguida, foi realizada tricotomia do escalpo com uma tesoura e a fixação do animal em estereotático (KOPF; KOPF instruments; EUA). Após esse procedimento é realizada a assepsia do escalpo com iodo, e após essa assepsia, é realizada uma injeção subcutânea de lidocaína (lidocaína a 2% em solução de NaCL 0,15M) na região em que será feita a incisão. Após a incisão do escalpo, a porção dorsal do crânio foi exposto e o tecido conjuntivo foi removido utilizando hastes de algodão embebidas com solução salina estéril 0,15 M. Os animais tiveram sua temperatura mantida por meio de um sistema de aquecimento que utiliza água quente, desenvolvido pela equipe, esse equipamento mantinha os animais em temperaturas em torno de 37 °C.

O bregma foi a região referência, situado na região ântero-posterior e médio -lateral, e foram feitas duas craniotomias, que se situavam-se no hemisfério esquerdo segundo as coordenadas: [ântero-posterior (AP): -5,4mm; médio-lateral (ML) -4,6mm; dorso-ventral(DV) -2,5mm para o CA1 e ântero-posterior (AP) +3,0 mm; médio-lateral (ML) 0,5mm; dorso-ventral (DV) -3,5mm para o mPFC (PAXINOS; WATSON, 1998) (PAXINOS; WATSON, 2017). Além desses orifícios para os dois parafusos na região occipital, foram colocados mais três parafusos (um na região frontal e dois no parietal, um em cada um dos lados) para manter o implante firme.

Primeiramente foram implantados dois eletrodos monopolares formados cada um por 1 fio de tungstênio encapado com teflon (60 µm de diâmetro interno; A-M Systems, Inc., EUA), o primeiro foi implantado na região do mPFC e o outro no hipocampo dorsal em CA1, e além disso junto aos parafusos colocados nos orifícios do occipital, para o aterramento e referenciamento, foram soldados um conector com dois fios de prata.

Após a inserção nos substratos os eletrodos foram cimentados com acrílico dental autopolimerizável. Em seguida o eletrodo inserido em CA1 é cimentado com o mesmo acrílico. A descida dos eletrodos de registro era acompanhada do registro do LFP garantindo assim o correto posicionamento na coordenada dorso-ventral (DV), através de inspeção visual é identificado a presença de teta em CA1 e de delta no mPFC.

Após os implantes e cimentação dos eletrodos em mPFC e CA1, um terceiro eletrodo era colocado, um pouco maior e com a ponta dobrada, que era colocado na musculatura do animal.

Esse eletrodo foi usado para o registro do EMG, que será importante para a classificação dos estágios de sono posteriores.

Após a cirurgia, os animais foram tratados profilaticamente, com uma solução anti-inflamatória (Intervet) (Fluxinina, 5 mg/kg) e solução pentabiótica (Zoetis) (19 mg/kg) todas por via intramusculares, aguardando um período de recuperação de 7 dias.

4.4 APARATO EXPERIMENTAL

Os registros foram realizados em uma caixa (30x30x30cm) dentro de uma gaiola de *Faraday*. Os sinais foram filtrados e amplificados (0,1 Hz – 1 KHz, 1000x) (Am systems Amplifier), e digitalizado a 4 KHz (Power Lab, AD Instruments) e então adquiridos pelo LabChart, um *software* de registro.

Os sinais adquiridos no LabChart durante o registro são: mPFC, CA1, EMG, e um quarto canal que recebe um sinal gerado por um Arduino com um pulso a cada 10 segundos e com um sinal luminoso de um Led em paralelo, que está na área da filmagem do animal, para a sincronização do registro na fase da análise dos dados.

Os experimentos comportamentais foram realizados na mesma caixa (30x30x30cm) em que os registros foram feitos.

4.5 LESÃO ELETROLÍTICA, PERFUSÃO E FIXAÇÃO DO TECIDO NERVOSO

Após o último dia de registro os animais foram anestesiados novamente com uma superdose de cetamina e complemento de xilazina, e passaram por um protocolo de estimulação elétrica, esse protocolo era realizado por um único pulso elétrico de 1,5 uA através dos eletrodos, para uma gerar uma lesão eletrolítica. Em seguida os animais passavam pelo procedimento de perfusão pela aorta, com uma solução tampão fosfato-salina (PBS – 250 MI) e paraformaldeído a 4% (PFA – 200 MI) para fixação.

Os encéfalos foram extraídos após a perfusão e imersos em uma solução de PFA a 4% por 24h e em seguida crioprottegidos em soluções alternadas de sacarose 10, 20 e 30% a cada dia por três dias. Logo após esse procedimento que iria desidratar os cérebros, eles foram em seguida congelados por submersão em isopentano (~40s) e guardados em freezer -80 °C.

4.6 HISTOLOGIA

Após o processo de congelamento por submersão em isopentano, os cérebros passaram por cortes transversais de 30 μm realizados no criostato da marca Leica modelo CM1850, em busca das regiões de interesse mPFC e CA1, por toda a faixa anteroposterior em que as lesões foram realizadas.

Esses cortes foram colocados em solução tampão PBS e, com o auxílio de pincéis foram colocados em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram coradas com a técnica padrão de Cresil-Violeta e montadas com lamínulas para visualização em microscópio. Depois de montadas foi feita uma verificação da posição do eletrodo, e com a ajuda de um microscópio.

Todas as imagens que possibilitaram a visualização da lesão dos eletrodos, foram fotografadas e usadas para validação histológica.

4.7 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental (**figura 3-C**) mostra o dia 0 como sendo o dia em que os animais passaram por um período de habituação, nesse momento os animais ficaram 8 horas na caixa onde esses mesmos animais foram registrados, para se habituarem ao espaço de experimentação.

No dia 1 (**figura 3-C**) os animais foram submetidos aos registros de LFP's (mPFC e CA1 e EMG) por 8 horas, além da filmagem dos registros.

No início do dia 2 (**figura 3-C**), os animais, agora separados nos grupos salina 0,9% (n=6), COCA-2.5 (n=6) e COCA-15 (n=4), passaram pelo treinamento (aquisição) da tarefa de memória de localização de objetos (MLO), como já descrito (MAINGRET, et al, 2016). Nessa tarefa os animais foram apenas filmados, devido ao ruído proveniente da grande movimentação. Depois da tarefa comportamental, os animais eram desconectados para receberem um injeção sistêmica de cocaína ou salina (dependente do grupo experimental e dose) (15 mg/kg ou 2.5 mg/kg (KNAPP., et al, 2007)), após a injeção, os animais foram submetidos ao registro eletrofisiológico e a filmagem durante o sono subsequente, com duração de 8 horas.

A dose de 2,5 mg/kg escolhida no presente estudo mostrou um aumento tardio do sono REM, sendo que a dose de 10 mg/kg apresentou uma latência maior para o sono, além de modificar os padrões dos estados de sono e vigília (KNAPP et al, 2007). Um trabalho feito com camundongos

mostrou o aumento da latência com efeito dose-dependente entre dosagens de 3.6mg/kg e 18mg/kg (BJORNESS & GREENE,2018), sendo determinado aqui as doses de 2,5mg/kg e 15mg/kg.

No terceiro dia, os animais foram submetidos a segunda parte do teste de localização de objetos (invocação) e a registros eletrofisiológicos por novamente 8 horas.

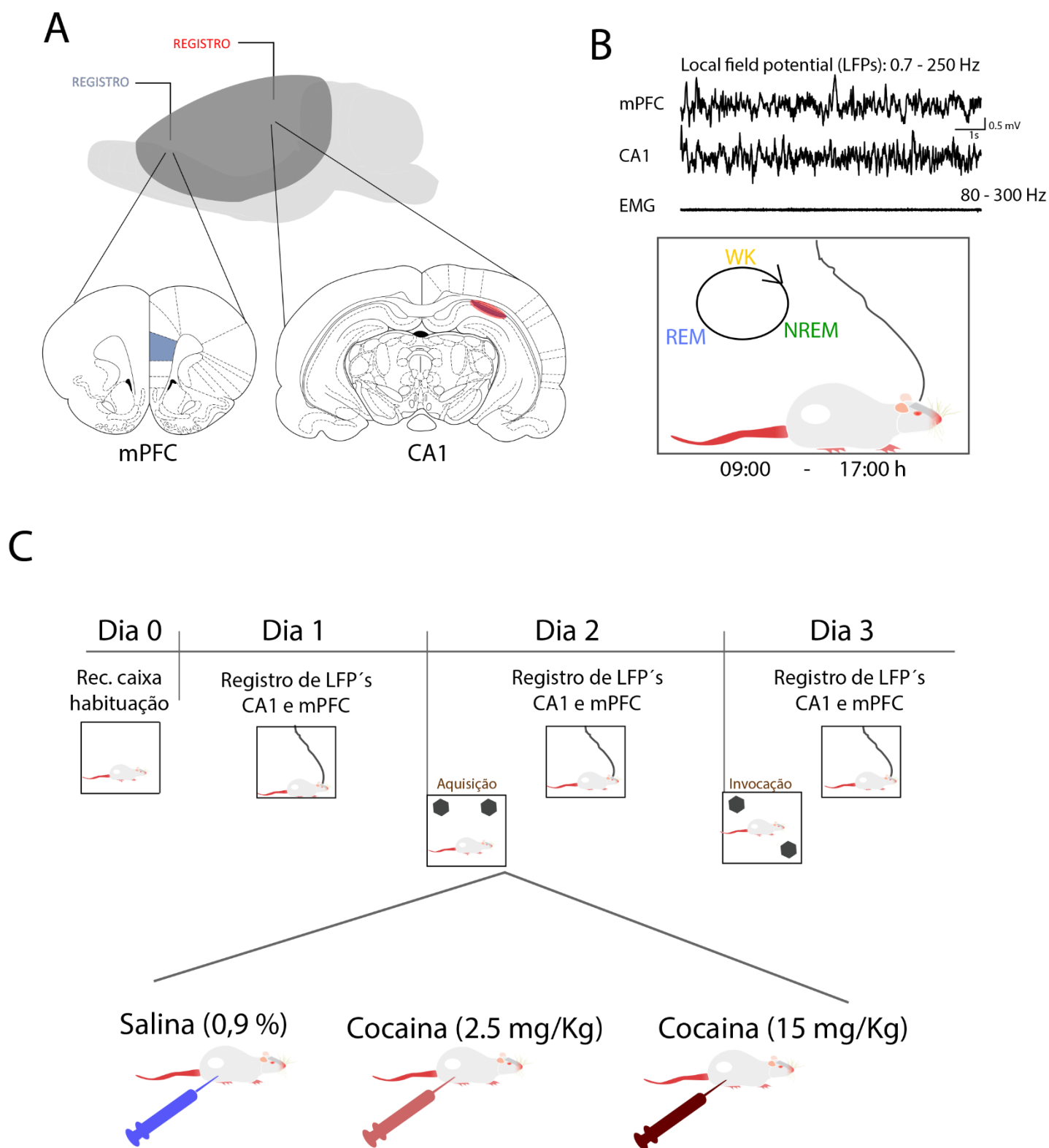


Figura 3. Cirurgia estereotáxica, registros eletrofisiológicos e paradigma experimental. **A.** Esquemas em visão lateral e cortes coronais do encéfalo de ratos. No encéfalo em visão lateral (acima), é possível visualizar os locais de inserção dos eletrodos de registro (Registro). Nos esquemas em cortes coronais, as regiões marcadas em vermelho representam os locais de inserção dos eletrodos (mPFC, à esquerda e CA1, à direita). **B.** Representação dos registros eletrofisiológicos. *Painel superior:* traçados em preto são exemplos representativos de traçados de registros de LFP

(mFPC e CA1), com os sinais filtrados na faixa 0.7-250 Hz e eletromiograma (EMG), com o sinal filtrado na faixa 80-300 Hz. *Painel inferior*: ilustração dos procedimentos executados com um animal mantido na caixa, conectado ao sistema de aquisição de dados. C. Paradigma experimental.

4.8 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETO

O teste de localização de objetos tem sido utilizado como uma ferramenta para a avaliação da relevância funcional da coordenação hipocampo-cortical durante o sono (WARBURTON., BROWN, 2015; NORMAN, 2010).

(MAINGRET, et al., 2016) mostrou que a coordenação entre *ripples* hipocampais e *delta-spindles* registradas no córtex durante o sono subsequente ao aprendizado foi maior quando os animais puderam explorar a caixa com os objetos por 20 minutos, comparado com a situação na qual os animais puderam explorar os objetos por 3 minutos.

Os autores também observaram que o índice de discriminação de objetos no dia do teste também foi maior nos animais que exploraram livremente os objetos por 20 minutos durante o treino do dia anterior. A figura 3 mostra o desenho experimental do presente estudo.

O teste consistia em posicionar dois objetos no dia 2, em uma caixa de acrílico, com uma das paredes da caixa, (parede oposta aos objetos), com um fundo em duas cores (branco e preto). O assoalho da caixa foi dividido em quatro quadrados, e os dois objetos idênticos eram posicionados no lado oposto ao da parede com o fundo em duas cores, os objetos eram trocados por uma tabela em que permite alternar o posicionamento em cada um dos animais, essa tabela seguida um esquema de rotatividade, para sempre oferecer um local diferente dos objetos para cada um dos animais seguintes.

Os animais foram colocados na caixa, e era permitido que eles explorassem toda a arena com os dois objetos, por 3 ou 20 minutos, essa quantidade de tempo seguiu as especificações do teste usado em MAINGRET, et al., 2016, que conseguiu testar o processo de consolidação de memória, através do teste de localização de objeto, esse tempo foi equiparado aqui no nosso trabalho, ao desempenho previsto, de acordo com a concentração da cocaína injetada posteriormente, sendo que de acordo com nossa hipótese o grupo com uma dose menor (2,5mg/kg) apresentaria um melhor desempenho. Foi convencionado que os animais que iriam receber a solução de 2.5mg/kg explorariam a caixa por 3 minutos, e os animais que iriam receber a solução de 15mg/kg ou apenas salina iriam explorar a caixa por 20 minutos.

Após o tempo de exploração definido pelos dois grupos, os animais passavam por um pré-registro de LFP's por 10 minutos além de serem filmados.

Após o tempo de pré-registro os animais recebiam injeções intraperitoneais (I.p) de cocaína (MERCK) diluída em solução de salina (solução de NaCl a 15M), e em seguida permaneciam na caixa para o registro e filmagem por 8 horas do sono subsequente.

No dia 3 (figura 3) os animais eram colocados na mesma arena, mas com um dos objetos em um quadrante diferente do que estava posicionado no dia 2, e foi permitido a exploração por 5 minutos em ambos os grupos (2.5mg/kg e 15 mg/kg).

Após a exploração os animais foram conectados ao sistema para o registro e a filmagem do sono subsequente, por 8 horas.

5. PRÉ-PROCESSAMENTO DOS REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS

Os registros de LFP e EMG foram processados e analisados utilizando a ferramenta MATLAB® R2018b (MathWorks®). Os blocos de dados referentes aos registros de um mesmo animal foram temporalmente ordenados. Inicialmente, foram removidas quaisquer tendências constantes existentes nos registros utilizando-se a função *detrend*. Posteriormente, os dados foram reamostrados de 4 KHz para 800 Hz, utilizando a função *decimate* e filtrados por um filtro passa-banda (LFPs = 0.7-250 Hz; EMG = 80-300 Hz), utilizando a função *eegfilt*. Ainda, cada bloco de dados foi dividido em janelas de 10 segundos, que foram posteriormente concatenados temporalmente, gerando matrizes bidimensionais cujas linhas definem as épocas de 10 segundos e as colunas definem cada uma das amostras presentes na janela. Por fim, os índices de início e fim dos registros de cada um dos três dias foi armazenado.

5.1 CÁLCULO DA DENSIDADE ESPECTRAL DE POTÊNCIA, RMS DO EMG E INTEGRAÇÃO DE POTÊNCIA DE BANDAS

Os valores quadráticos médios (RMS) de cada uma das épocas de 10 segundos dos registros das regiões CA1 e mPFC, e EMG foram calculados. Tais valores foram utilizados para definir as épocas com a presença de artefatos através do padrão de distribuição em um gráfico de dispersão.

A seleção das épocas com artefatos foi realizada manualmente, através de uma inspeção visual dos dados, com posterior seleção das épocas com o valor quadrático médio suficientemente altos para estarem isolados do conjunto principal de épocas. Tal processo foi repetido utilizando-se o valor quadrático médio e o número de cruzamentos em zero (*zero-crossing*) das épocas de 10 segundos do registro do mPFC. Por fim, essas épocas foram excluídas das análises, sendo, porém, mantidos nas matrizes de dados a fim de preservar a fidelidade temporal dos registros.

O cálculo da estimativa da densidade espectral de potência de cada época dos LFPs foi realizado utilizando a função *pwelch* (comprimento da janela: 2048; amostras sobrepostas: padrão; número de pontos discretos da transformada de Fourier: 10240; taxa de amostragem: 800 Hz). Em seguida, os valores de densidade espectral de potência foram integrados em bandas específicas (Delta: 1-4 Hz; Teta: 5-12 Hz; Gama-baixa: 30-55Hz; Gama alta: 65-100 Hz) que foram normalizadas pela densidade espectral de potência total do sinal (calculada desconsiderando a potência da faixa 55-65Hz).

5.2 CLASSIFICAÇÃO DOS ESTÁGIOS DO CICLO SONO-VIGÍLIA

A razão das potências normalizadas das bandas Teta e Delta (potência de Teta / potência de Delta) foram calculadas a partir do LFP registrado em CA1. Posteriormente, foi gerado um modelo de distribuição de mistura gaussiana (GMMModel) ajustado aos valores de RMS do EMG e a razão Teta/Delta (LFP de CA1) de cada uma das épocas de 10 segundos. O modelo possui 3 componentes e foi gerado utilizando a função *fitgmdist*. Os clusters foram definidos utilizando um limite mínimo de 95% para a probabilidade posterior de cada época (observação) estar em um dado componente. As épocas que não atendiam ao limite mínimo para nenhum dos componentes foram rotuladas como não classificadas, sendo eliminadas de análises posteriores. Cada um dos três componentes (clusters) foi classificado como um dos estágios do ciclo sono-vigília. O componente cujas épocas possuíam alta razão Teta/Delta e baixo valor de RMS do EMG foi classificado como sono *REM*. Já o componente cujas épocas possuíam moderada a baixa razão Teta/Delta e alto valor de RMS do EMG foi classificado como estado de vigília (aWK). Por fim, o terceiro componente, cujas épocas possuíam baixa razão Teta/Delta e baixo valor de RMS do EMG foi classificado como sono não *REM* (*NREM*).

5.3 ARQUITETURA DO SONO

A porcentagem do número de épocas de cada estágio foi calculada através da razão do número absoluto de épocas em cada um dos estágios pelo número total de épocas classificadas (as épocas não classificadas foram desconsideradas). Cada conjunto de épocas consecutivas (mínimo de duas épocas consecutivas) de estágios iguais, entre vigília, NREM e REM, foram chamados de “*bouts*”. Portanto, o tempo mínimo para um *bout* foi de 20 segundos e a incidência de *bouts* de cada estágio foi expressa pela razão do número de *bouts* pelo tempo total (em minutos) de épocas classificadas.

A duração dos *bouts* leva em consideração o mesmo critério de definição de *bouts* e é definida pelo comprimento absoluto (em segundos) de cada *bout* de dado estágio.

5.4 LATÊNCIA PARA SONO

As épocas de 10 segundos foram divididas entre seus respectivos dias e latência para o sono de cada um dos animais foi determinada para cada um dos 3 dias de registro. O marco de início do sono foi definido como o momento em que em uma janela de 5 minutos, 80% das épocas foram classificadas como sono NREM ou REM. A latência para o sono, foi definida, portanto, como o período de tempo entre o início do registro do dia e o marco de início do sono. Já a latência para sono REM foi definida como o período de tempo entre o marco de início do sono e o primeiro episódio (época de 10 segundos) de sono REM.

5.5 DENSIDADE ESPECTRAL DE POTÊNCIA

Cada um dos dias foi dividido em períodos da manhã e tarde, como descrito anteriormente. Os períodos da manhã e tarde foram divididos em 3 partes, cada um deles, totalizando 6 partes por dia.

Os valores de densidade espectral de potência dos LFPs de CA1 e mPFC (normalizada pela potência total), para cada época, foram integrados para as bandas Delta (1-4 Hz), teta (5-12 Hz) e

gama (30-55 e 65-80 Hz). Foi feita a média da potência das épocas de sono REM e, posteriormente, das épocas de sono nREM, para cada um dos 6 períodos de cada dia. Os primeiros períodos de cada dia foram eliminados da análise devido ao baixo número de épocas de sono nREM ou REM. Além disso, para os grupos Coca 15mg/Kg e Coca 2.5mg/Kg, apenas os 3 períodos da tarde do segundo dia foram incluídos já que o número de épocas de sono é insuficiente.

Cada uma das épocas teve seu valor de potência normalizado pela média dos 6 períodos do primeiro dia.

5.6 ESPECTROGRAMAS

Os espectrogramas para cada um dos dois distintos registros de LFP (mPFC e CA1) foram gerados através da função *spectrogram*. Para tal, os dados lineares de LFP (não separados em blocos) foram utilizados. No caso de partes do registro que não possuíam continuidade, os valores de potência foram calculados separadamente e posteriormente concatenados. Os parâmetros utilizados foram: taxa de amostragem: 800 Hz; comprimento da janela: 2400 amostras (3 segundos), sobreposição: 400 amostras; frequências discretas: 0-10 Hz, com saltos de 0.0196 Hz ($nfft = 512$);

5.7 COERÊNCIA ESPECTRAL VIA MULTI-TAPER

O cálculo da coerência espectral levou em consideração o conjunto de dados eletrofisiológicos de CA1 e mPFC. Foi realizado o cálculo da coerência para cada época de 10 segundos de forma individual. Para tal, foi utilizada a função *coherency* do pacote *Chronux Matlab 2.12 v03*. Os parâmetros utilizados foram: taxa de amostragem: 800 Hz; banda de frequência: 0-200 Hz; *Tapers*: [3 5]; cálculo do erro: [2 0.05]; média entre ensaios (*trials*): 1 (verdadeiro); fator de preenchimento do fft: 0; janela deslizante: [3 1];

As épocas foram separadas em seus respectivos dias. Além disso, foram definidos critérios de separação de épocas entre cada um dos estágios do ciclo sono-vigília. Ficou convencionado que dentre as épocas de vigília (aWK), foram selecionadas apenas aquelas existentes nas três primeiras horas após o início do registro de cada dia. Dentre as épocas de sono REM, foram selecionadas

apenas aquelas existentes no período da tarde. A escolha das épocas de sono REM no período da tarde, se baseia no fato de que os animais apresentaram épocas de sono de maior duração nesse período. Ainda, a média dos valores de coerência para os componentes de frequência da banda Teta (nesse caso, 5-9 Hz) foi calculada para cada uma das épocas. Por fim, foi feita a média dos valores de coerência da banda Teta das épocas de sono REM e posteriormente das épocas de vigília.

A frequência de pico de coerência em Teta de cada época, para cada dia, foi definida como o componente de frequência entre 5-9 Hz que possui o maior valor de coerência. Já o valor de coerência no pico é o próprio valor máximo de coerência encontrado.

Para a criação da função de distribuição cumulativa empírica (CDF) os valores de coerência das épocas dos estágios de sono REM e vigília foram separados em seus respectivos dias. Por fim, foram utilizados como valores de entrada para a função *cdfplot*.

5.8 ACOPLAMENTO DE FREQUÊNCIA CRUZADA

O acoplamento de frequência cruzada entre componentes de frequência do registro de CA1 foi definido utilizando-se a rotina para o cálculo do índice de modulação (MI), como descrito por Tort et al., 2008. Inicialmente foram gerados comodulogramas, obtidos como resultado da aplicação de várias medidas de MI a pares de faixas de frequências filtradas para a fase e amplitude. As frequências de fase foram divididas em 18 “bins” (intervalos de 20°). As frequências selecionadas para a fase iniciam-se em 1 Hz até 20 Hz, com saltos de 1 Hz e largura de banda de 4 Hz. Já as frequências selecionadas para a amplitude iniciam-se em 10 Hz até 200 Hz, com saltos de 4 Hz e largura de banda de 15Hz.

Cada uma das épocas de 10 segundos teve o MI calculado para cada um dos pares de frequências de fase e amplitude. Posteriormente, as épocas foram divididas em seus respectivos dias e em seus respectivos estágios do ciclo sono-vigília. Ainda, foi feita a média dos valores de MI para cada um desses subgrupos de épocas, permitindo a seleção de faixas de frequência de fase e amplitude para posteriores análises.

Para análises comparativas entre grupos, definiu-se pares de faixas de frequência de fase e amplitude específicos. Para a fase, a faixa de frequência selecionada foi 4-7 Hz (teta). Para a

amplitude, foram selecionadas duas faixas de frequência: 70-90 Hz (gama alta) e 100-140 Hz (Oscilações de alta frequência ou *HFO*). Inicialmente, o registro do LFP de CA1 passou por um filtro “*notch*” (120 Hz) com largura 0,007. O cálculo do MI para cada um dos dois pares (teta/gama alta e teta/*HFO*) utilizou o mesmo método já descrito, porém limitado a apenas tais faixas de frequência.

Por fim, os valores de MI de cada uma das combinações teta/gama alta e teta/*HFO* foram selecionados. Foi realizada a média dos valores de MI das épocas de sono REM (apenas nos períodos da tarde) e vigília (apenas épocas das 3 primeiras horas de registro) para cada um dos animais. Os valores de MI foram normalizados pela média dos valores de MI do primeiro dia.

Para a criação da função de distribuição cumulativa empírica (CDF) os valores de MI das épocas dos estágios de sono REM e vigília foram separados em seus respectivos dias. Por fim, foram utilizados como valores de entrada para a função “*cdfplot*”.

Para o cálculo da correlação de Pearson, os dados de entrada foram as combinações entre o MI e a densidade espectral de potência das faixas de frequência da fase e amplitude usadas para o cálculo do MI. Para tal, foram utilizadas as funções “*corr*” e “*polyfit*” (grau: 1) a fim de calcular o coeficiente de correlação linear e obter os coeficientes para o ajuste linear do dado, respectivamente.

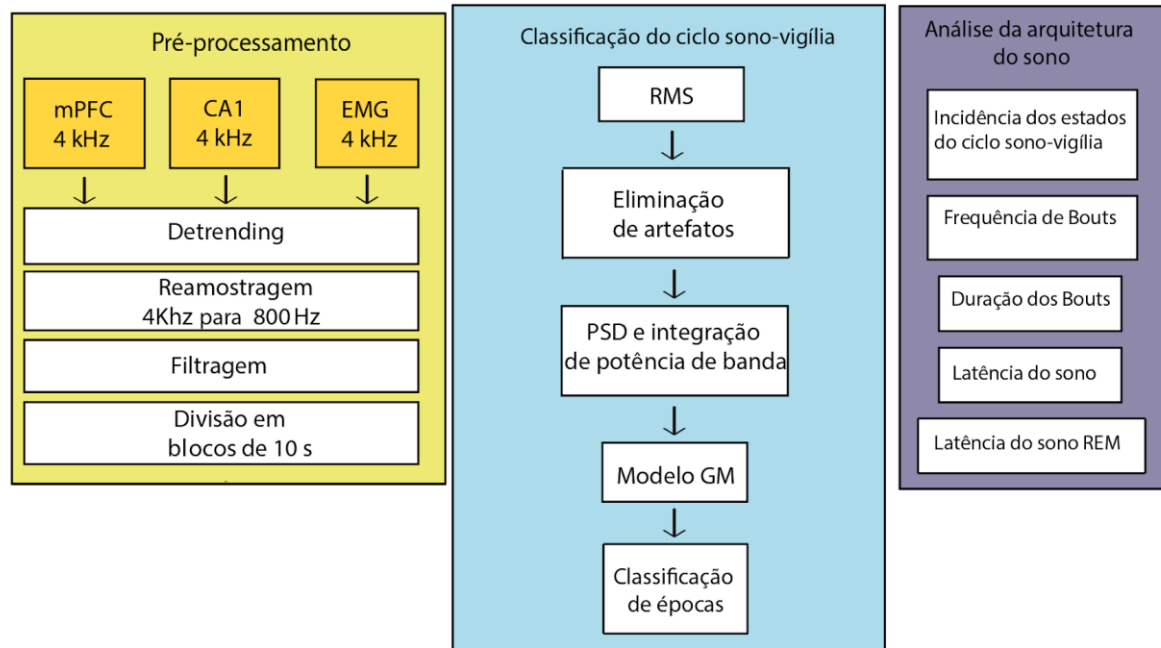
5.9 DETECÇÃO DE RIPPLES

Para a detecção de ripples, os registros de LFP de CA1 divididos em blocos de 10 segundo foram filtrados na faixa de 140-220 Hz. A detecção ocorreu individualmente em cada uma das épocas de sono NREM. As amostras de cada uma dessas épocas, foram elevadas pela potência de 2, a fim de manter todos os valores positivos. Posteriormente o sinal foi normalizado utilizando o z-score.

Foram definidos dois limiares a partir da média e do desvio padrão (SD) do sinal. Foram selecionados como eventos putativos os índices que atingiam o limiar de 3 SD e o início do evento foi definido como o índice (anterior ao pico) cujo valor cruzasse o limiar de 1 SD e o fim do evento foi definido como o índice (posterior ao pico) cujo valor cruzasse o limiar de 1 SD.

Ainda, foram aplicados limiares de duração para os eventos. Foram apenas aceitos eventos com uma duração mínima de 50 ms e duração máxima de 450 ms. Eventos consecutivos com uma distância menor que 50 ms foram considerados um único evento.

A



B

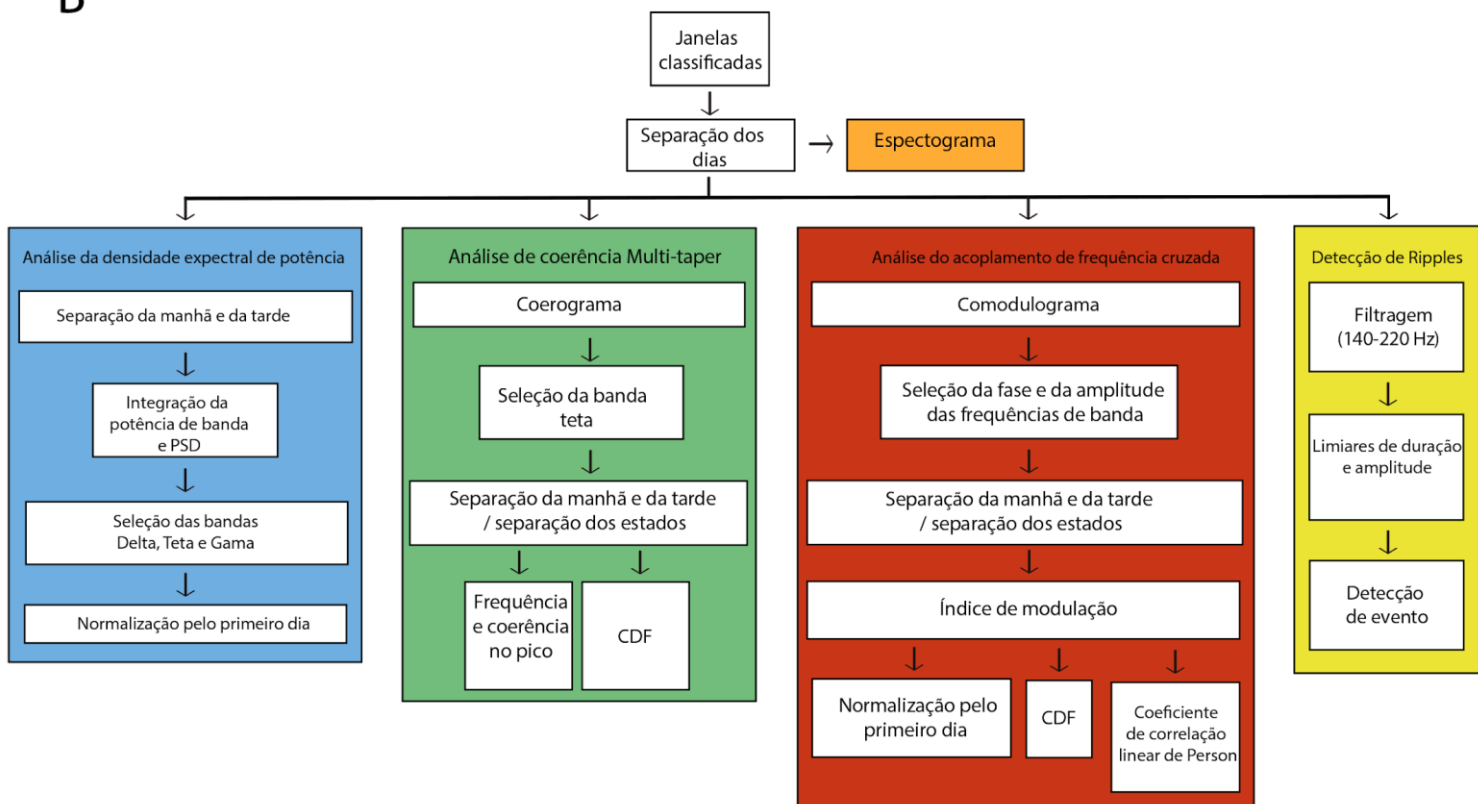


Figura 4. Fluxograma das análises executadas. **A.** *Painel à esquerda:* pré-processamento dos registros de potencial de campo local (LFP) do córtex pré-frontal medial (mPFC), de LFP de CA1 e do eletromiograma (EMG). *Painel central:* classificação dos estágios do ciclo sono-vigília, incluindo a eliminação de períodos com artefatos, utilizando os valores quadráticos médios (RMS) dos registros de LFP. *Painel à direita:* análises da arquitetura do sono, incluindo

incidência dos estágios do ciclo sono-vigília, frequência de “*bouts*”, duração dos “*bouts*”, latência para sono e latência para sono REM. **B.** Análises de padrões oscilatórios realizadas após a classificação dos estágios do ciclo sono-vigília.

6. RESULTADOS

6.1 CONFIRMAÇÃO HISTOLÓGICA DO POSICIONAMENTO DOS ELETRODOS

Como descrito anteriormente, a cirurgia estereotáxica foi realizada com o objetivo de implantar eletrodos de tungstênio especificamente na região pré-límbica do mPFC e em CA1 do hipocampo. A **figura 3** sintetiza informações sobre a confirmação histológica do posicionamento destes eletrodos. A **figura 3-A** mostra o mapa do posicionamento dos eletrodos no mPFC e CA1 em 5 dos 16 animais registrados. As análises histológicas dos demais animais ainda está em andamento, por isso algumas das figuras estão em branco. A **figura 3-B** traz exemplos típicos onde a lesão da própria entrada do eletrodo foi visível o suficiente para a confirmação do posicionamento dos eletrodos no mPFC e CA1. Para obter informações adicionais sobre o posicionamento dos eletrodos na região de CA1, calculamos as médias dos registros de potencial de campo local em torno das ripples detectadas de cada um dos animais (**figura 3-C**). Cada um dos traçados representa a média dos sinais de LFP bruto em torno de cada *ripple* detectada (300 ms antes e 300 ms após pico de amplitude do evento detectado). As médias de cada um dos animais estão organizadas de acordo com a profundidade inferida do campo de contato do eletrodo de registro em CA1. Tal profundidade foi inferida avaliando-se as diferentes assinaturas eletrográficas presentes nos traçados médios, como demonstrado por YLINEN et al., 1995. A presença de oscilações de alta frequência no centro de todas as médias confirmam o posicionamento correto dos eletrodos na camada piramidal de CA1. Note que a presença de *sharp-waves* em alguns dos animais (R1, R11 e R23) sugere que os eletrodos foram posicionados de forma um pouco mais ventral do que os demais. Porém, a coexistência de *sharp-waves* e *ripples* nestes animais sugere que os eletrodos foram posicionados no *stratum radiatum*, ou seja, ainda em CA1.

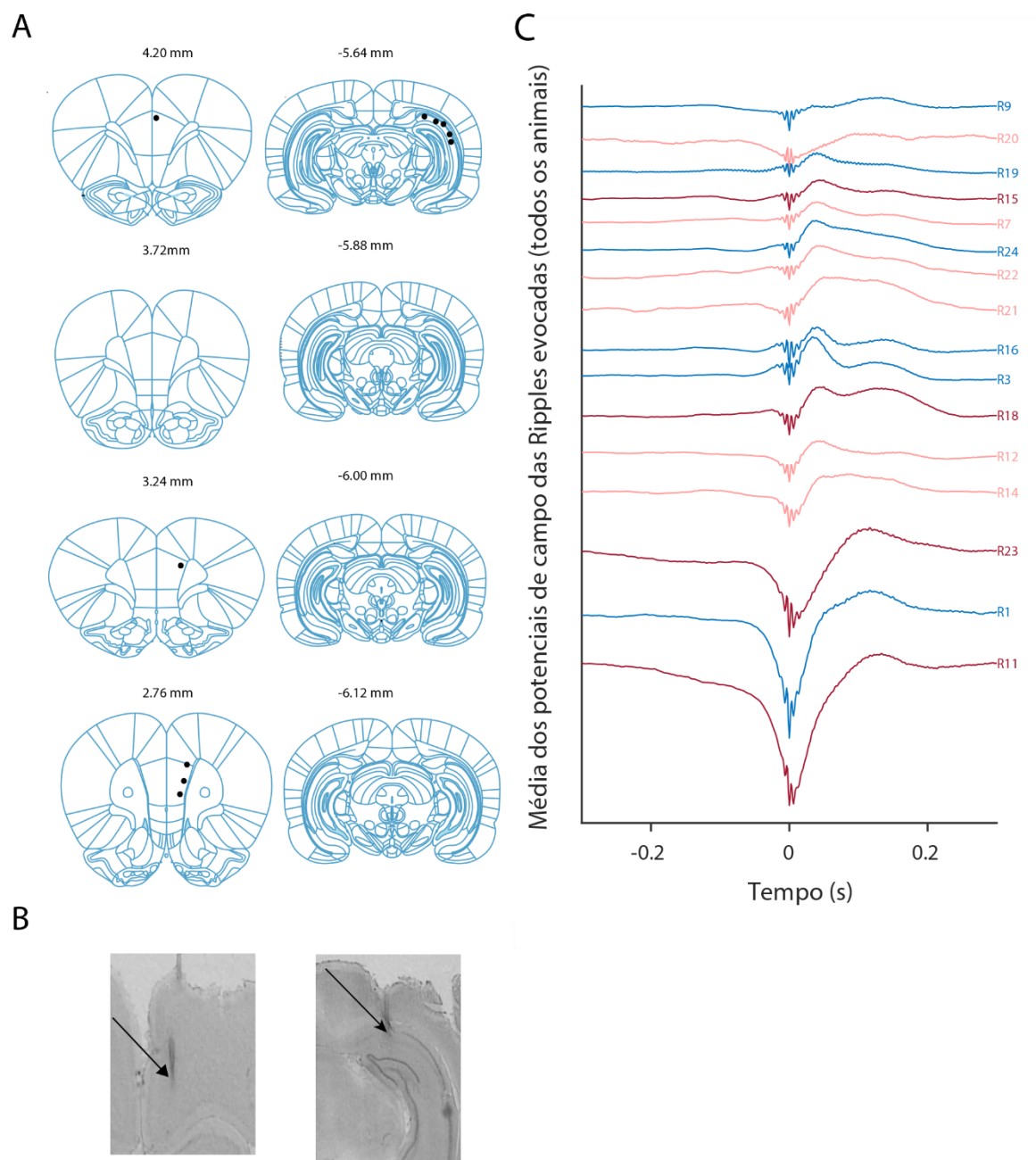


Figura 5. Histologia e validação do posicionamento dos eletrodos. **A** - Representação esquemática de cortes histológicos do encéfalo de ratos apresentado o posicionamento dos eletrodos como pontos pretos. As representações de cortes histológicos à esquerda mostram o posicionamento dos eletrodos de registro no córtex pré-frontal medial (mPFC). Já as representações de cortes histológicos à direita mostram o posicionamento dos eletrodos de registro em CA1. Há uma concentração dos eletrodos nas regiões próximas ou exatamente na camada de células piramidais. **B** - Exemplos representativos de cortes histológicos demonstrando o posicionamento dos eletrodos no mPFC (figura da esquerda) e em CA1 (figura da direita). **C** - Traçados das médias dos registros de potencial de campo em torno das ripples detectadas de cada um dos animais. Cada um dos traçados representa a média dos sinais de LFP bruto em torno de cada *ripple* detectada (300 ms antes e 300 ms após pico de amplitude do evento detectado).

6.2 VALIDAÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DE ESTADOS COMPORTAMENTAIS DURANTE SONO-VIGÍLIA

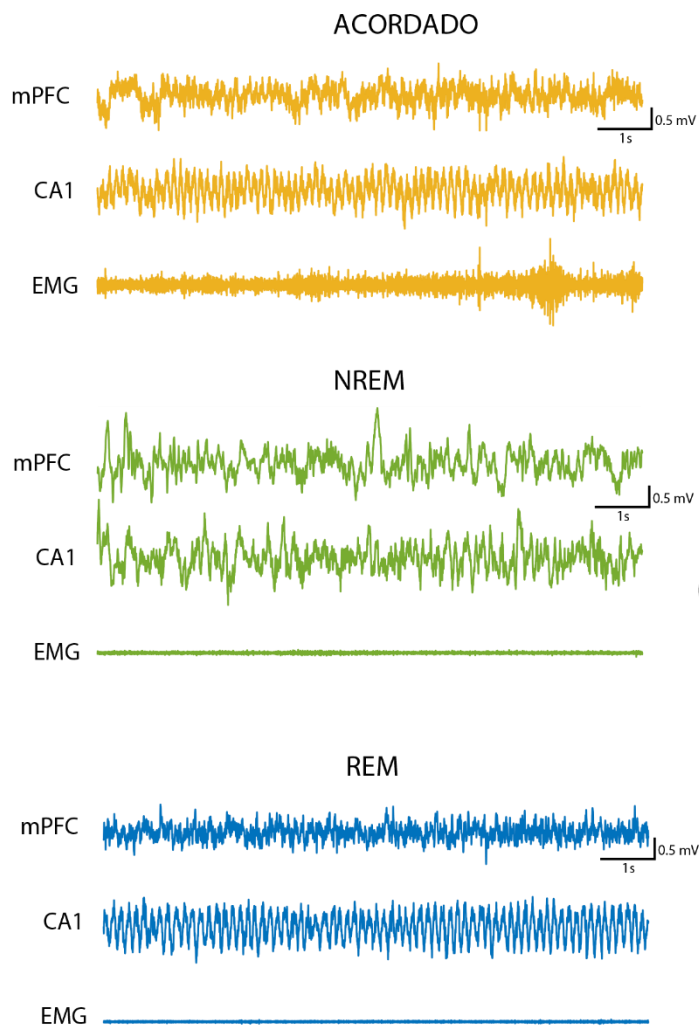
Após confirmar o posicionamento dos eletrodos e realizar o pré-processamento dos sinais registrados (**figura 4-A**) e separação das épocas em diferentes fases do ciclo sono-vigília utilizando GMM (**figuras 4-A e 6-B**), validamos a classificação dos estados comportamentais por meio de avaliação das densidades de potências espectrais médias para cada estado (ACORDADO, NREM e REM) registrados no Dia 1 (condição prévia ao tratamento). Na **figura 6-A**, os traçados amarelos representam épocas típicas de vigília (ACORDADO), nos quais há uma elevação da amplitude do EMG, com aumento da frequência das oscilações em CA1 e mPFC. Os traçados verdes representam épocas típicas da fase não-REM (NREM), nos quais há uma sincronização da atividade oscilatória, havendo um aumento na amplitude e uma redução da frequência das oscilações no mPFC e em CA1. Ainda, podemos observar uma redução da amplitude do EMG, indicando uma redução da atividade muscular. Por fim, os traçados azuis representam épocas da fase REM, nos quais há redução da atividade muscular evidenciada pela redução da amplitude do EMG e dessincronização da atividade oscilatória dos registros de LFP. Há um aumento na frequência das oscilações dos registros de LFP, assemelhando-se à atividade oscilatória encontrada no decorrer de épocas de comportamento exploratório durante a vigília. Na **figura 6-C**, as linhas amarelas representam a densidade espectral de potência média das épocas de vigília (WAKE)(ACORDADO), as linhas verdes representam as épocas de sono NREM e as linhas azuis representam as épocas de sono REM. Particularmente, no mPFC há uma predominância de componentes de baixa frequência (< 4 Hz) durante NREM. Além disso, há um pico na faixa correspondente a teta (aproximadamente, 5-9 Hz) na média das épocas de sono REM e um aumento de potência na mesma faixa de frequência na média das épocas ACORDADO. Já em CA1, há uma predominância de componentes de baixa frequência (< 4 Hz) na média das épocas NREM. Como esperado, também observamos um pico bastante proeminente na faixa correspondente a teta na média das épocas de sono REM. Durante ACORDADO, um pico em teta ainda encontra-se proeminente, porém com potência reduzida em relação ao REM. Em seguida, também avaliamos a coerência de amplitude média entre os registros de LFP do mPFC e CA1 (**figura 7-B**). Na média das épocas NREM, há um predomínio da coerência de amplitude entre CA1 e mPFC nos componentes de frequência mais baixos (< 4 Hz). Na média das épocas ACORDADO, há um alto valor de coerência relacionados às baixas frequências (< 4 Hz), porém há um pico de coerência na

faixa 5-9 Hz. Por fim, na média das épocas REM, há um predomínio da coerência na faixa 5-9 Hz, atingindo um valor próximo a 0.75.

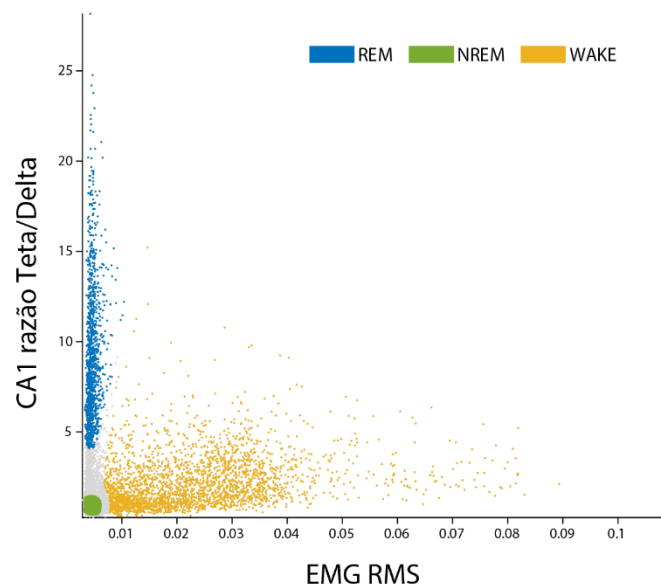
A comunicação entre as áreas do mPFC e CA1 é demonstrada aqui, através da comunicação de gama no mPFC e da faixa de teta em CA1, encontrada nos resultados descritos, que mostraram predominância dessas faixas nessas regiões. Assim como a literatura descreve, o hipocampo recruta o mPFC durante alguns comportamentos nesse recrutamento o teta hipocampal coordena, ou modula a atividade da faixa de gama no mPFC, esses eventos também geram janelas de oportunidade de transferência de memória, e alguma interrupção ou erro nesse processo de acoplamento é encontrado em patologias como o caso da esquizofrenia (COLGIN., 2013)

Concluimos, portanto, que os padrões oscilatórios observados durante ciclo de sono-vigília dos animais registrados neste estudo em condição basal (Dia 1) estão de acordo com a literatura (WATSON & BUZSÁKI, 2013; BUZSÁKI, 2006; RASCH AND BORN, 2006; PACE-SCHOTT & HOBSON, 2002; SULLIVAN et al, 2014; SIAPAS et al, 1998; SIROTA et al, 2003).

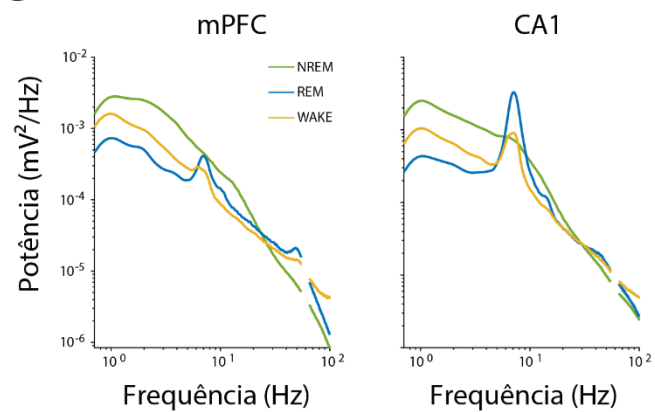
A



B



C



D

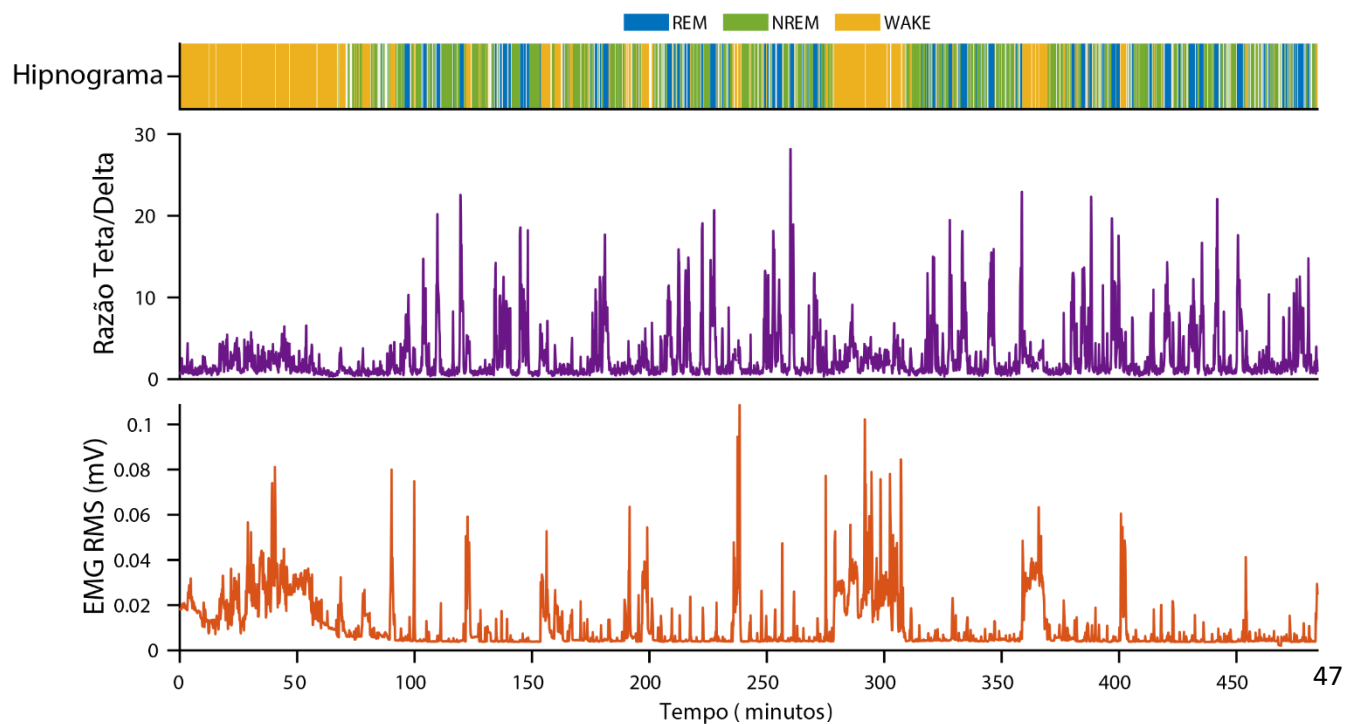


Figura 6. Classificação dos estágios do ciclo sono-vigília. **A.** Exemplos de traçados representativos de LFP (mPFC e CA1) e EMG para cada um dos estágios do ciclo sono-vigília. **B.** Exemplo de clusterização realizada utilizando o modelo de distribuição de mistura gaussiana “*GM Model*”. As variáveis utilizadas para gerar o modelo são expressas nos eixos (razão Teta/Delta de CA1 e o RMS do EMG). **C.** Exemplos representativos de densidade espectral de potência média dos registros de LFP do mPFC e CA1. **D** - Exemplo representativo de hipnograma e relação com a razão Teta/Delta obtida a partir da análise do LFP do hipocampo e RMS do EMG ao longo do tempo.

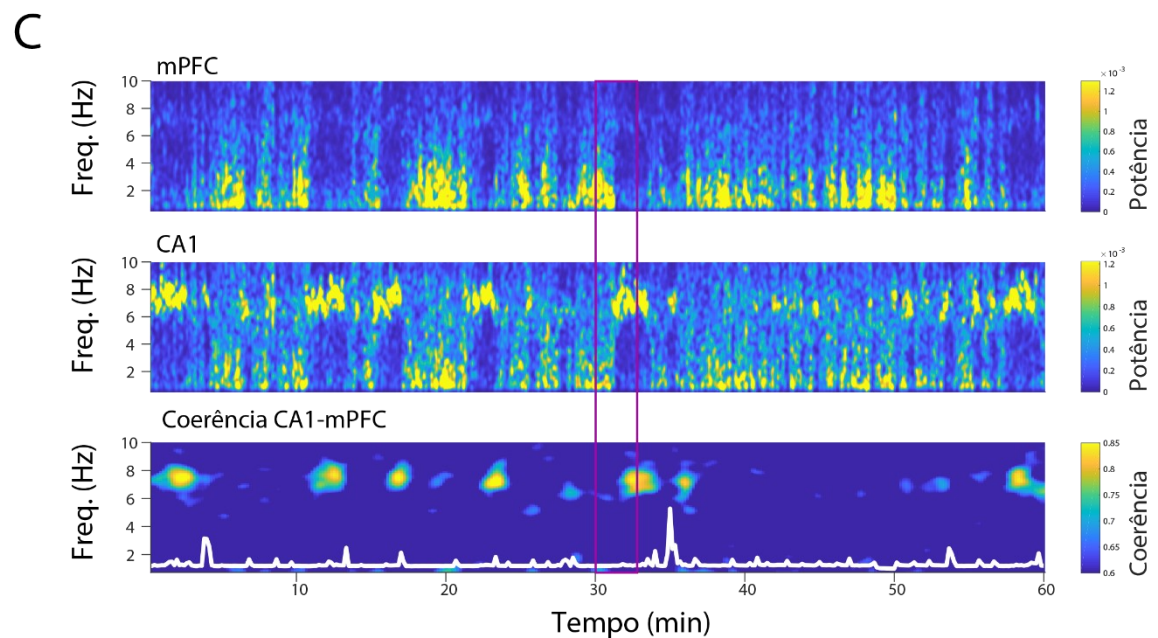
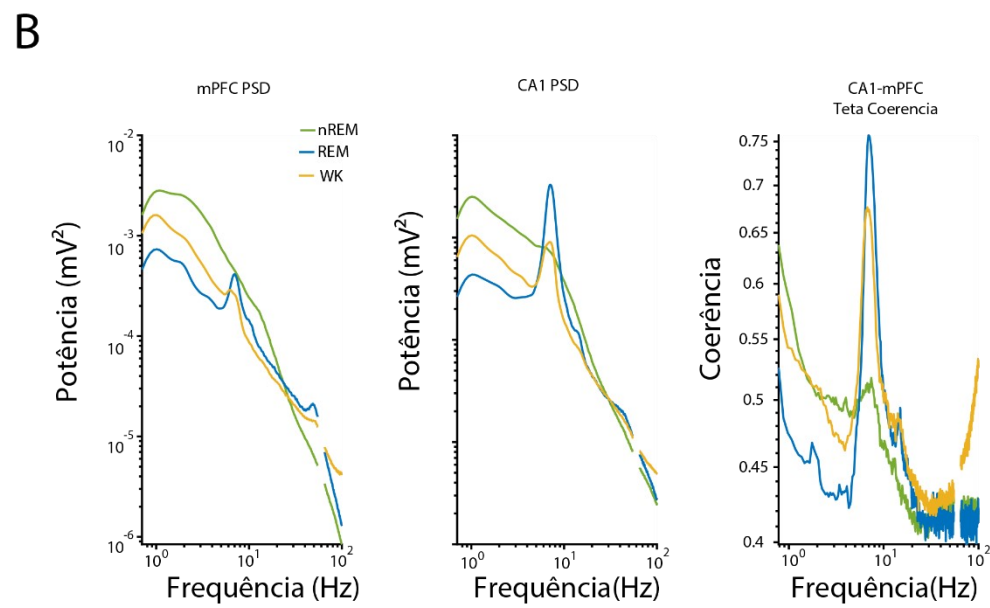
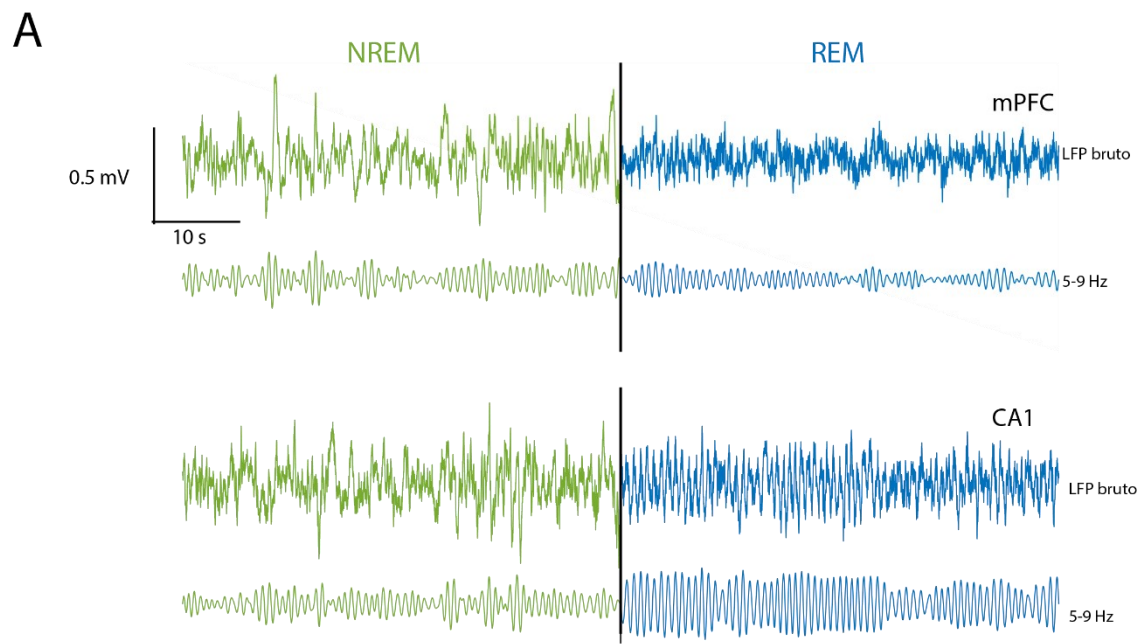


Figura 7. Dinâmica oscilatória e coerência de amplitude entre CA1 e mPFC durante o sono normal. A. Exemplo representativo de traçados de LFP registrados no mPFC (parte superior) e CA1 (parte inferior) obtidos de um animal tratado com salina. B. Exemplos representativos de densidade espectral de potência média dos registros de LFP do mPFC e CA1 C. Exemplos representativos de espectrogramas e dinâmica da coerência mPFC-CA1 ao longo de um período de 60 minutos. As linhas vermelhas indicam um período com alta potência na faixa 1-4 Hz no mPFC e CA1, e baixo valor de coerência na faixa 5-9 Hz.

6.3 DINÂMICA OSCILATÓRIA E COERÊNCIA DE AMPLITUDE ENTRE CA1 E MPFC DURANTE O SONO NORMAL

Durante o sono normal podemos encontrar um exemplo do traçado descrito na **figura 7-a** que mostra os LFP's registrados no mPFC (parte superior) e em CA1 (parte inferior), os dados mostrados no traçado em verde são representativos de épocas NREM, nas quais o LFP bruto apresentando oscilações lentas, sincronizadas e de alta amplitude, tanto no mPFC quanto em CA1. Já o LFP filtrado na faixa 5-9 Hz apresenta variações de amplitude com baixa sincronia entre as regiões do mPFC e CA1, evidenciando uma baixa coerência de amplitude da faixa 5-9 Hz durante as épocas NREM.

Os traçados azuis de registros de LFP bruto representam épocas REM, onde a coerência em teta (5-9 Hz) aumenta. Logo abaixo, há um sinal filtrado na faixa 5-9 Hz que ilustra a maior sincronia de amplitude em teta entre as regiões do mPFC e CA1. No terço final da época representativa de REM, há um exemplo de micro-acordar, em que há uma ligeira diminuição da frequência do sinal, bem como uma ligeira redução da coerência de amplitude entre as regiões CA1 e mPFC.

O exemplos representativos de densidade espectral de potência média dos registros de LFP do mPFC e CA1 na **figura 7-b** apresentam painéis à esquerda e ao centro, nesses painéis, as linhas amarelas representam a densidade espectral de potência média das épocas de vigília (*WAKE*), enquanto as linhas verdes representam as épocas de sono NREM e as linhas azuis representam as épocas de sono REM. No painel à direita o exemplo representativo da coerência de amplitude média entre os registros de LFP do mPFC e CA1. A codificação de cores para os estágios distintos do ciclo sono-vigília é mantida. Na média das épocas NREM, há um predomínio da coerência de amplitude entre CA1 e mPFC nos componentes de frequência mais baixos (< 4 Hz). Na média das épocas WAKE, há um alto valor de coerência relacionados às baixas frequências (< 4 Hz), porém há um pico de coerência na faixa 5-9 Hz. Por fim, na média das épocas REM, há um predomínio da coerência na faixa 5-9 Hz, havendo um pico na faixa 5-9 Hz próximo de 0.75.

Na **figura 7-C** é possível observar os exemplos representativos de espectrogramas e dinâmica da coerência de mPFC-CA1 ao longo de um período de 60 minutos. No painel superior dessa figura o espectrograma do mPFC está indicando a variação da potência dos distintos componentes de frequência (0.7 - 10 Hz; indicados no eixo Y) ao longo de um período de sono. A escala de cor indica que quanto mais próximo do amarelo, maior a potência de tal componente de frequência. Há uma variação cíclica na potência da faixa 1-4 Hz, evidenciando a entrada (alta potência) e saída (baixa potência) das épocas NREM.

No painel central nota-se o espectrograma do CA1 indicando a variação da potência dos distintos componentes de frequência. Há uma variação cíclica na potência da faixa 6-8 Hz, evidenciando a entrada (alta potência) e saída (baixa potência) das épocas REM. O padrão cíclico da faixa 1-4 Hz é semelhante ao espectrograma do mPFC, indicando o mesmo padrão de entrada e saída do sono NREM. No painel inferior nota-se a dinâmica da coerência de amplitude mPFC-CA1. O padrão de cor da escala foi mantido, indicando uma variação cíclica da coerência na faixa 6-8 Hz. O aumento da coerência nessa faixa indica épocas de sono REM, sendo acompanhado pelo aumento da potência da faixa 6-8 Hz em CA1, nas mesmas épocas (como visto no painel do centro). O traçado em branco é o RMS do EMG ao longo do período de 60 minutos. Existem pequenos picos no traçado do RMS logo após épocas de alta potência e coerência na faixa 6-8 Hz (REM), indicando micro-acordares. As linhas vermelhas indicam um período com alta potência na faixa 1-4 Hz no mPFC e CA1, e baixo valor de coerência na faixa 5-9 Hz (como expresso na **figura 7-a**, no exemplo do sono NREM) e um outro período com baixa potência na faixa 1-4 Hz no mPFC e CA1, alta potência na faixa 5-9 Hz em CA1, e alto valor de coerência na faixa 5-9 Hz (como expresso na **figura 7-b**, no exemplo do sono REM).

6.4 EFEITOS DE DIFERENTES DOSES DE COCAÍNA SOBRE O CICLO SONO-VIGÍLIA

Uma vez confirmados o posicionamento dos eletrodos e a classificação dos estados comportamentais, examinamos como diferentes doses de cocaína (2,5 mg/kg e 15 mg/kg, i.p) afetam o ciclo sono-vigília. Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com cocaína em doses acima de 10 mg/Kg é capaz de aumentar significativamente a latência para início do sono. Por outro lado, a dose de 2,5 mg/kg mostrou-se ser capaz de produzir um aumento tardio do tempo despendido em sono REM (KNAPP et al, 2007). No presente estudo, tentamos reproduzir este

achado para, em seguida, tentar compreender melhor como o acoplamento oscilatório entre hipocampo e córtex pré-frontal medial é alterado em diferentes momentos pós-tratamento.

A **figura 8-B** sintetiza os principais resultados obtidos em relação aos efeitos da cocaína sobre a latência para NREM e REM. Nossos resultados mostram que ambas as doses testadas produziram um aumento significativo da latência para início do sono no dia 2 [SAL(D2) vs COCA-2.5(D2): +143%; SAL(D2) vs COCA-15(D2): +451%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(4, 26) = 20,56$, $p < 0,0001$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2) vs COCA-2.5(D2); $p=0,0044$, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p < 0,0001$]. Contudo, não observamos diferenças significativas entre os grupos nos dias 1 (D1: linha de base) e 3 (D3: 24h depois do tratamento). Em relação ao sono REM, nenhuma das doses testadas produziu uma alteração significativa da latência para sono REM em comparação com o grupo SAL ($p > 0,05$). Além disso não observamos variação dos grupos ao longo do tempo ($p > 0,05$).

A **figura 8-C** mostra o tempo despendido médio em cada um dos estágios do ciclo sono-vigília. Os três gráficos superiores representam a porcentagem média do tempo despendido em cada um dos estágios durante o período da manhã. Ambas as doses de cocaína provocaram um aumento do tempo despendido no estágio WAKE no D2 [SAL(D2) vs COCA-2.5(D2): +72%; SAL(D2) vs COCA-15(D2): +144%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(4, 26) = 5,822$, $p = 0,0017$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2) vs COCA-2.5(D2); $p=0,0121$, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p < 0,0001$]. Além disso, ambas as doses de cocaína provocaram uma diminuição do tempo despendido no sono NREM no D2 [SAL(D2) vs COCA-2.5(D2): -73%; SAL(D2) vs COCA-15(D2): -975%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(4, 26) = 6,599$, $p = 0,0008$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2) vs COCA-2.5(D2); $p=0,0201$, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p < 0,0001$]. Entretanto, não foi observado nenhuma diferença significativa no tempo despendido no sono REM entre os grupos ao longo do tempo ($p > 0,05$). Já os três gráficos inferiores representam a porcentagem média do tempo despendido em cada estágio durante o período da tarde. Nenhuma das doses produziu uma alteração significativa no tempo despendido no estágio WAKE ou no sono NREM ao longo dos dias, em relação ao grupo SAL ($p > 0,05$). Ainda, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação ao tempo despendido no sono REM, porém há uma diferença estatisticamente significativa em relação ao fator tempo no grupo COCA-15, havendo um aumento no tempo despendido em REM no D3 em relação ao D2 [COCA-15(D2) vs COCA-15(D3): +126%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Tempo: $F(2, 26) = 4,099$, $p = 0,0284$, teste *post hoc* de Tukey, COCA-15(D2) vs COCA-15(D3); $p = 0,0201$].

A **figura 8-E** sintetiza os resultados obtidos a respeito dos efeitos da cocaína na duração dos “*bouts*” em cada um dos estágios do ciclo sono-vigília. Os três gráficos superiores apresentam a duração média dos “*bouts*” (em segundos) durante o período da manhã. Apenas a dose de cocaína 15 mg/Kg foi capaz de produzir um aumento significativo na duração dos “*bouts*” do estágio WAKE no D2 em relação ao grupo SAL [SAL(D2) vs COCA-15(D2): +285%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo : $F(4, 26) = 6,249$, $p = 0,0012$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2) vs SAL(D2); $p < 0,0001$]. Contudo, em relação à duração média dos “*bouts*” das fases de sono NREM e REM, nenhuma das doses de cocaína provocou diferenças significativas em relação ao grupo controle, ao longo do tempo. Já os três gráficos inferiores apresentam a duração média dos “*bouts*” (em segundos) durante o período da tarde. De forma semelhante ao período da manhã, apenas a dose de cocaína 15 mg/Kg foi capaz de produzir um aumento significativo na duração dos “*bouts*” do estágio WAKE no D2 em relação ao grupo SAL [SAL(D2) vs COCA-15(D2): +140%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo : $F(4, 26) = 5,607$, $p = 0,0022$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2) vs SAL(D2); $p = 0,0008$]. Entretanto, em relação à duração média dos “*bouts*” das fases de sono NREM e REM, nenhuma das doses de cocaína provocou diferenças significativas em relação ao grupo controle, ao longo do tempo ($p > 0,05$). Estes resultados em conjunto, confirmam os achados publicados anteriormente a respeito da ação da cocaína e anfetamina sobre o sono (HILL et al. 1977; PONOMARENKO et al., 2003; KNAPP., et al., 2007). Entretanto, nossos achados sobre os efeitos da cocaína 2,5 mg/kg no ciclo sono-vigília corroboram, parcialmente, os resultados obtidos por KNAPP et al, 2007, que reportou um aumento da latência para sono nesta dose. Por outro lado, não observamos efeitos sobre o tempo despendido em sono REM.

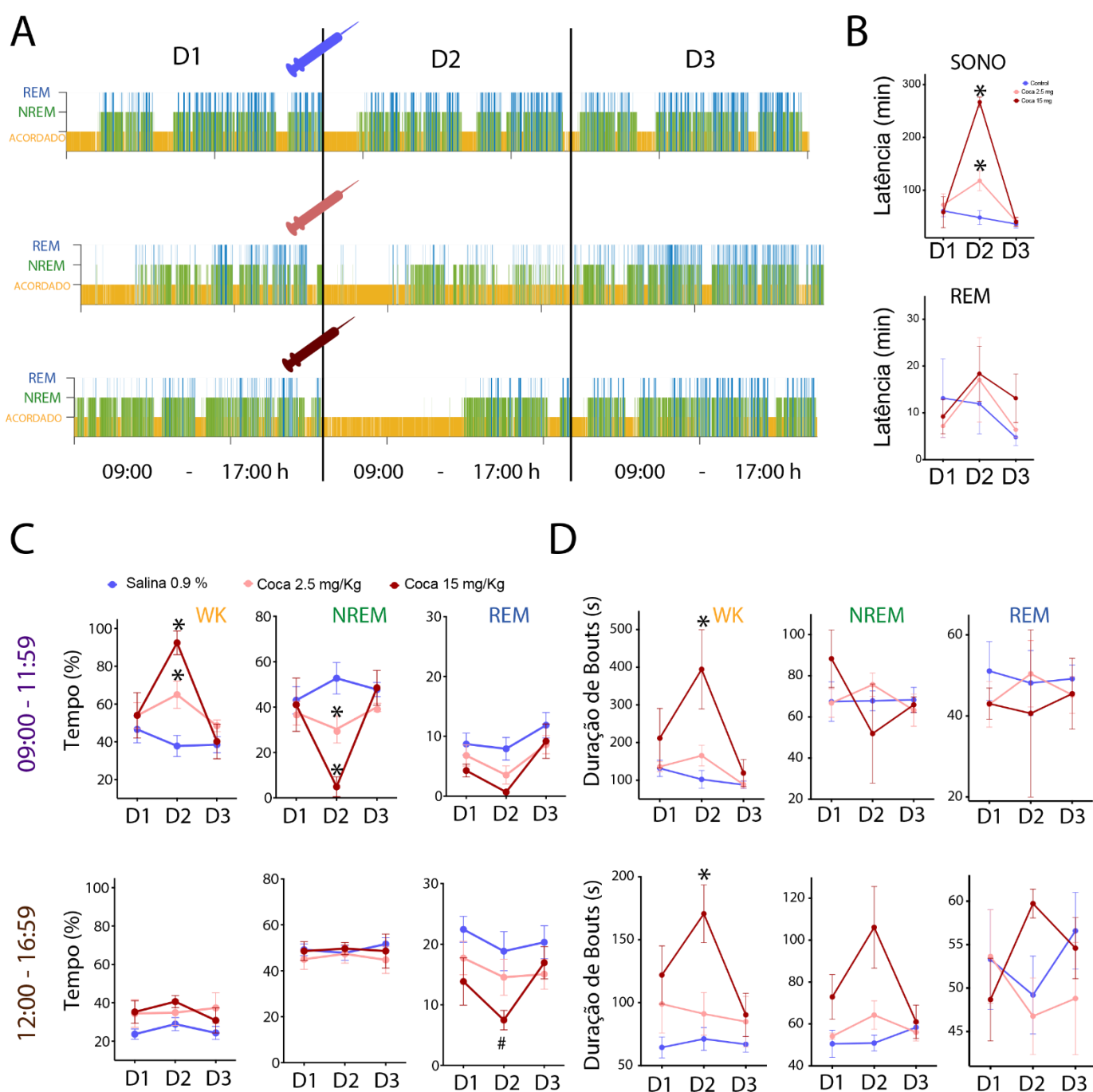


Figura 8. Alterações na arquitetura do sono induzidas por cocaína. **A.** Exemplos representativos de hipnogramas obtidos de animais pertencentes ao grupo controle (SAL) e aos dois grupos experimentais (COCA-2.5 e COCA-15). A diferença de nível e de coloração das colunas verticais dos hipnogramas representam os distintos estágios do ciclo sono-vigília: o nível mais baixo (amarelo) representa as épocas ACORDADO, o nível intermediário (verde) representa as épocas NREM e o nível superior (azul) representa as épocas REM. **B.** Latência para o sono e para o primeiro episódio de REM: na figura superior, está expresso a latência média (em minutos) para o início do sono nos três dias. Na figura inferior, está expressa a latência média (em minutos) para o início do sono REM nos três dias. **C.** Tempo despendido em cada um dos estágios do ciclo sono-vigília(ACORDADO(WK); NREM e REM. **D.** Tempo despendido em cada um dos estágios do ciclo sono-vigília.

6.5 EFEITOS DA COCAÍNA SOBRE A COERÊNCIA DE AMPLITUDE ENTRE CA1 E MPFC

A comunicação entre hipocampo e mPFC parece ser essencial para processos de aprendizagem e consolidação de memória (TORT et al., 2009; SKELIN, KILIANSKI, MCNAUGHTON.,2019; ESCHENKO et al., 2008). Por exemplo, BENCHENANE et al. 2010 avaliaram a coerência em teta entre CA1 e mPFC em ratos durante aprendizagem de novas regras em labirinto em Y. Dentre outros achados, os autores observaram que a coerência em teta entre as duas regiões avaliadas atingia um valor máximo no ponto de decisão do labirinto (imediatamente antes da bifurcação dos braços). Tal aumento de coerência foi reproduzido em animais anestesiados por meio de infusão intracerebral de dopamina (BENCHENANE et al., 2010). Em um estudo mais recente, foi demonstrado que a preferência condicionada por lugar (PCL) induzida por cocaína, um modelo amplamente utilizado para avaliar comportamentos relacionados a dependência, está associada a aumento do acoplamento oscilatório entre hipocampo e nucleus accumbens durante o sono (SJULSON et al., 2018). Entretanto, até onde vai nosso conhecimento, os efeitos da cocaína sobre o acoplamento entre CA1 e mPFC ainda não foi descrito.

Para investigar essa questão, avaliamos a coerência em teta em diferentes momentos do ciclo sono vigília subsequente ao tratamento com cocaína 15 mg/kg e 2,5 mg/kg. A **figura 9** sintetiza os achados principais em relação a coerência média em teta entre CA1 e mPFC durante épocas de sono REM e WAKE após tratamento com cocaína. Em D2, apenas cocaína 15 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente a coerência média em teta nas épocas WAKE levando em conta as primeiras 3 horas após injeção em relação ao grupo SAL [SAL(D2) vs COCA-15(D2): +18%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo : $F(4, 26) = 12,45$, $p < 0,0001$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p < 0,0024$]. Não observamos alterações significativas induzidas pelos tratamentos sobre a coerência média das épocas de sono REM ao longo do tempo ($p > 0,05$). Além disso, não observamos diferenças entre os grupos quando comparados em D1 e D3 ($p > 0,05$). Portanto, a cocaína é capaz de afetar de forma transiente a coerência em teta entre CA1-mPFC durante o estado acordado, sem afetar o sono REM subsequente.

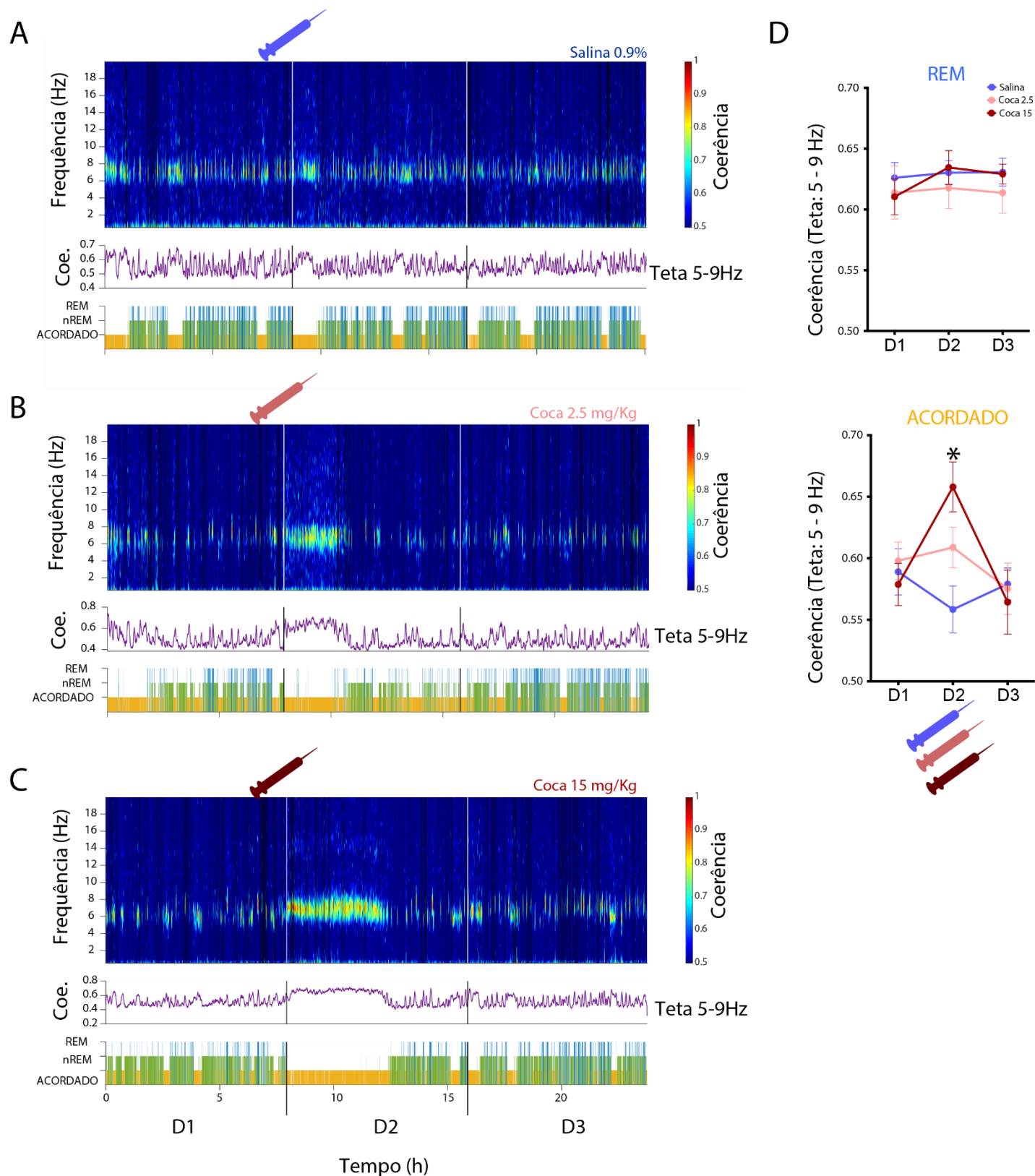


Figura 9. Alteração da coerência de amplitude CA1-mPFC induzida por cocaína. **A.** *Painel superior:* Exemplo da dinâmica de variação de coerência CA1-mPFC ao longo dos três dias de registro de um animal do grupo SAL. *Painel central:* Coerência média dos componentes de frequência da faixa 5-9 Hz ao longo dos três dias de registro (traçado roxo). **B.** Mesma organização do painel anterior, porém provindo de um animal representativo do grupo COCA-2,5, sendo a seringa rosa o marcador temporal da injeção sistêmica de cocaína na dose de 2,5 mg/Kg. **C.** Animal representativo do grupo COCA-15. Seringa vermelha representa o marcador temporal da injeção sistêmica de

cocaína na dose de 15 mg/Kg. **D.** Coerência média das épocas de sono REM e WAKE na faixa 5-9 Hz. *Painel superior:* Comparação das coerências médias das épocas de sono REM no período da tarde em cada um dos dias. *Painel inferior:* coerência média das épocas WAKE do período de até 3 horas após início do registro (D1 e D3) e após injeção (D2). Todos os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média.

6.6 ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR COCAÍNA NO ACOPLAMENTO TETA-GAMA E TETA-HFO DO HIPOCAMPO

A interação entre diferentes ritmos dentro um padrão oscilatório é denominado acoplamento entre frequências ou, em inglês, *cross-frequency coupling* (CFC). Diversos estudos têm proposto que o CFC pode ser importante na comunicação entre áreas, processamento sensorial, processamento de memória de trabalho e memória espacial (JENSEN AND COLGIN, 2007; AXMACHER et al., 2010; CANOLTY AND KNIGHT, 2010; JIRSA AND MÜLLER, 2013; HYAFIL et al., 2015). Uma das formas de se avaliar este acoplamento é pelo cálculo do *modulation index* (MI), desenvolvido pelo Prof. Adriano Tort do Instituto do Cérebro, UFRN-Natal (TORT et al., 2010).

Foi demonstrado recentemente que o acoplamento entre teta e gama apresenta-se aumentado durante tarefa de PCL induzida por heroína em ratos. Os autores argumentam que tais alterações poderiam estar subjacentes ao desenvolvimento de dependência em heroína (ZHU et al. 2019). O mesmo poderia acontecer com animais com cocaína, uma vez que o estudo mostra que as alterações de LPF acontecerem na área pré-límbica do mPFC, essa área está presente no feixe do CA1 e mPFC, apesar disso os dados aqui encontrados mostraram uma redução no acoplamento fase-amplitude, o que poderia ser explicado pelos eletrodos implantados estarem em áreas diferentes, necessitando um estudo específico da região pré-límbica do mPFC (ZHU et al. 2019; JAY & WITTER, 1991)

A **figura 10-C** sintetiza os resultados obtidos neste trabalho em relação aos efeitos da cocaína sobre o MI entre teta-gama (70 - 90 Hz) das épocas ACORDADO até 3 horas após início de registro (D1 e D3) ou tratamento (D2). Nenhuma das doses de cocaína produziu alterações no MI médio dos grupos experimentais, ao longo do tempo, comparando com o grupo SAL. A **figura 10-D** sintetiza os resultados obtidos em relação aos efeitos da cocaína sobre o MI entre teta-HFO (100 - 140 Hz) das épocas ACORDADO até 3 horas após início de registro (D1 e D3) ou tratamento (D2). Observamos que o tratamento com cocaína 15 mg/Kg foi capaz de promover uma redução do MI médio do grupo experimental em relação grupo SAL, no dia D2 [SAL(D2) vs COCA-15(D2): -29%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(4, 26) = 3,248$, $p = 0,0275$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p = 0,0028$].

A **figura 10-E** sintetiza os resultados obtidos em relação aos efeitos da cocaína sobre o MI teta-gama (70 - 90 Hz) das épocas de REM do período da tarde em cada um dos dias (D1 - D3). Nenhuma das doses de cocaína produziu alterações no MI médio dos grupos experimentais, ao longo do tempo, em relação grupo SAL ($p > 0,05$). A **figura 10-F** sintetiza os resultados obtidos em relação aos efeitos da cocaína sobre o MI teta-HFO (100 - 140 Hz) das épocas de REM do período da tarde em cada um dos dias (D1 - D3). Nenhuma das doses de cocaína produziu alterações no MI médio dos grupos experimentais, ao longo do tempo, em relação grupo SAL ($p > 0,05$). Em conclusão, o tratamento com cocaína 15 mg/kg foi capaz de diminuir o MI entre teta e HFO durante o estado acordado, sem produzir nenhum efeito subsequente durante sono REM.

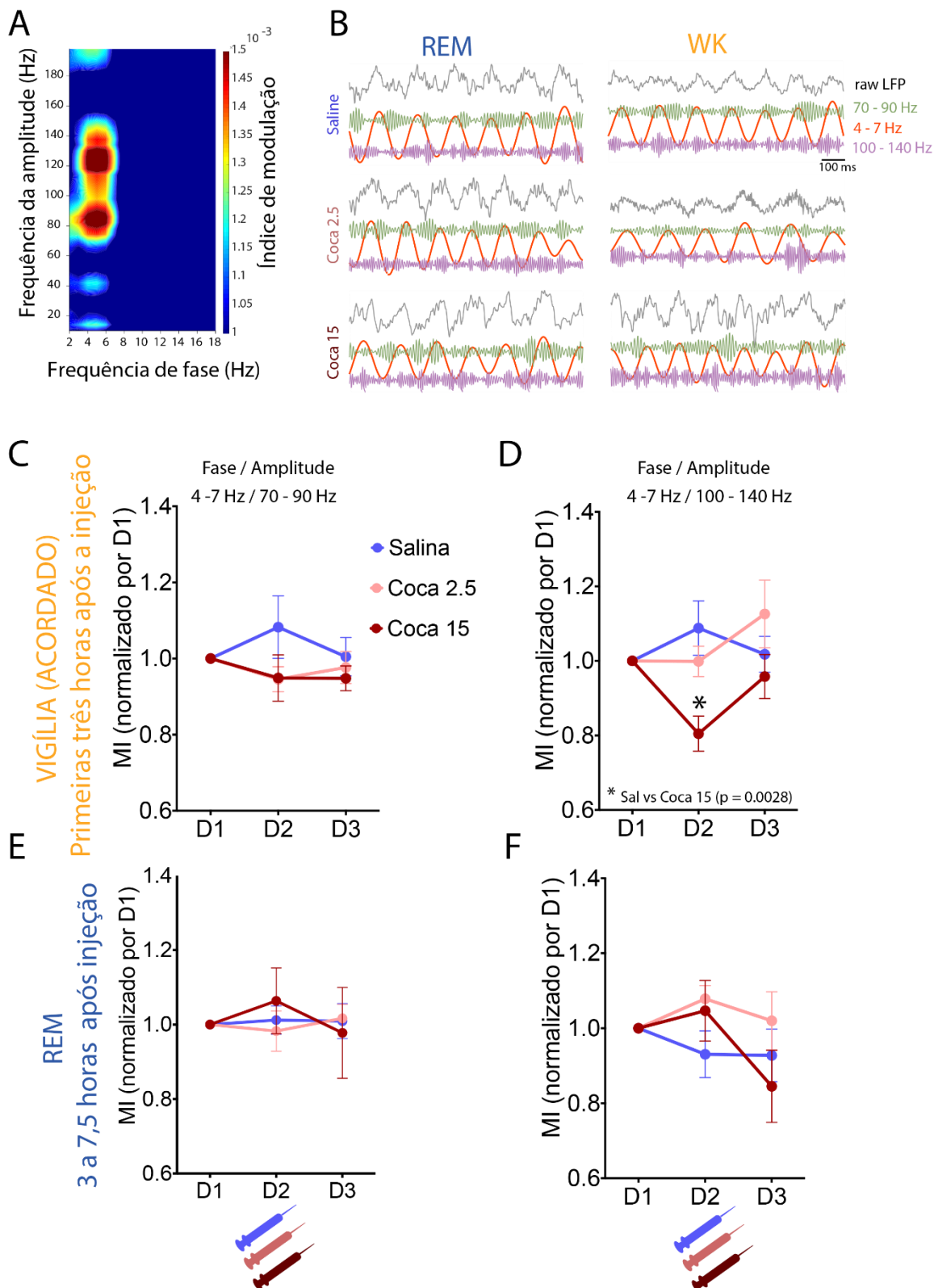


Figura 10. Alterações induzidas por cocaína no acoplamento da fase de Teta (4-7 Hz) e amplitude de Gama (70-90 Hz) e oscilações de alta frequência (100 - 140 Hz) em CA1. **A.** Comodulograma representativo da média dos índices de modulação (MI) das épocas REM do grupo SAL no dia D1. **B -** Exemplos representativos de traçados do registro de LFP de CA1, evidenciando o padrão de acoplamento da fase das oscilações na faixa 4-7 Hz com a amplitude das oscilações nas faixas 70-90 Hz e 100-140 Hz. **D.** Índice de modulação (MI) médio da fase de teta e amplitude de HFO (100-140 Hz) das épocas ACORDADO até 3 horas após início de registro (D1 e D3) ou tratamento (D2). **E.**

Índice de modulação (MI) médio da fase de teta e amplitude de Gama (70-90 Hz) das épocas REM do período da tarde. F. Índice de modulação (MI) médio da fase de Teta e amplitude de HFO (100-140 Hz) das épocas REM do período da tarde. Todos os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média.

6.7 EFEITO REBOTE DE ONDAS DELTA E INCIDÊNCIA DE RIPPLES DURANTE SONO NREM SUBSEQUENTE AO TRATAMENTO COM COCAÍNA

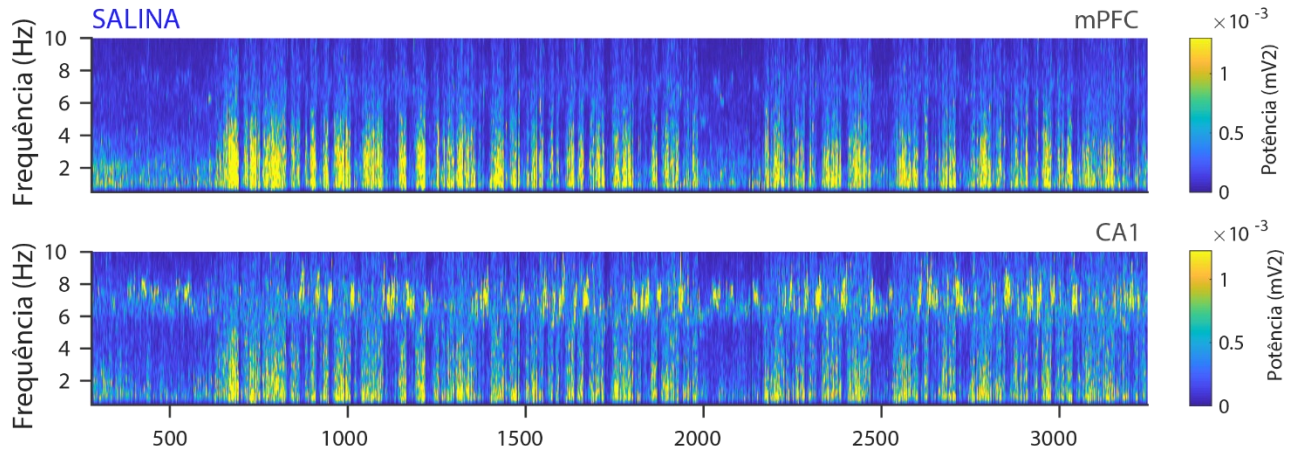
PONOMARENKO et al., 2003 demonstraram que o tratamento agudo com anfetamina foi capaz de produzir um aumento do tempo despendido em estado de alerta, seguido de um sono NREM com maior potência em delta associado a um aumento do número de *ripples* por minuto na região de CA1 do hipocampo. Considerando que tal efeito rebote pode ser relevante para o processo de formação de memórias de associação entre droga e contexto, nosso estudo investigou se a cocaína também seria capaz de produzir tal fenômeno adaptativo. O termo rebote é aqui utilizado, devido ao caráter dose-dependente da cocaína, que apresentou o mesmo padrão descrito por PONOMARENKO et al., 2003. A **figura 12-B** sintetiza os resultados referentes à avaliação da potência média da banda de delta do mPFC. Nenhuma das doses de cocaína foi capaz de causar alterações significativas sobre a magnitude da potência de delta em nos dias 1 e 3 ($p > 0,05$). Entretanto, ambas as doses de cocaína produziram um aumento significativo da potência média da banda delta no período D2-P4 (dia 2, quarta hora de registro), em relação ao grupo SAL [SAL(D2-P4) vs COCA-2,5(D2-P4): +16%; SAL(D2-P4) vs COCA-15(D2-4): +20%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(24, 156) = 4,03$, $p < 0,0001$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2-P4) vs COCA-2,5(D2-P4); $p < 0,0001$, SAL(D2-P4) vs COCA-15(D2-P4); $p < 0,0001$]. Além disso, ambas as doses de cocaína produziram um aumento significativo da potência média da banda delta no período D2-P6, em relação ao grupo SAL [SAL(D2-P6) vs COCA-2,5(D2-P6): +10%; SAL(D2-P6) vs COCA-15(D2-P6): +22%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(24, 156) = 4,03$, $p < 0,0001$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2-P6) vs COCA-2,5(D2-P6); $p = 0,0394$, SAL(D2-6) vs COCA-15(D2-P6); $p < 0,0001$]. Por fim, apenas a dose de cocaína 15 mg/kg produziu um aumento significativo da potência média da banda delta no período D2-P5, em relação ao grupo SAL [SAL(D2-P5) vs COCA-15(D2-P5): +21,7%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(24, 156) = 4,03$, $p < 0,0001$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2-P5) vs COCA-15(D2-P5); $p < 0,0001$]. Nenhuma das doses de cocaína foi capaz de produzir alterações significativas na potência de Delta em relação ao grupo SAL durante os outros períodos do dia D2.

A potência média de delta em CA1 também foi avaliada no sono NREM subsequente ao tratamento. Nenhuma das doses de cocaína foi capaz de causar alterações significativas potência

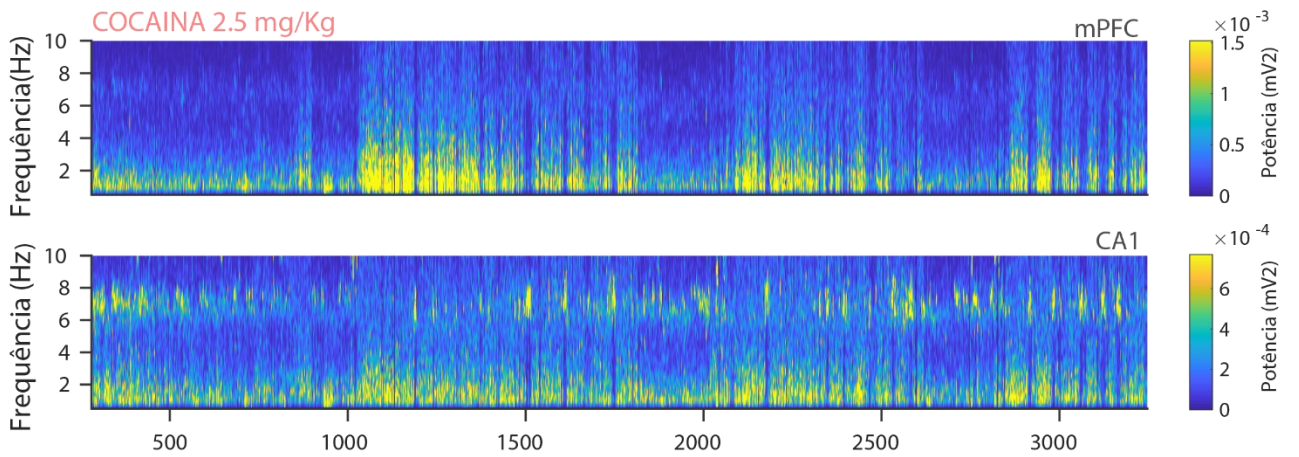
de Delta em nenhum dos 5 períodos de cada um dos dias D1 e D3. Entretanto, a dose de cocaína 15 mg/Kg produziu um aumento significativo da potência média da banda Delta nos períodos D2-4 e D2-5, em relação ao grupo SAL [SAL(D2-4) vs COCA-15(D2-4): +15,4%; SAL(D2-5) vs COCA-15(D2-5): +15,3%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(24, 156) = 3,504$, $p < 0,0001$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2-4) vs COCA-15(D2-4); $p = 0,0027$, SAL(D2-5) vs COCA-15(D2-5); $p = 0,0039$]. Nenhuma das doses de cocaína foi capaz de produzir alterações significativas na potência de Delta em relação ao grupo SAL durante os outros períodos do dia D2.

A **figura 13-C** mostra a incidência média de *ripples* ao longo dos dias D1-D3. Observamos que a dose de cocaína 15 mg/kg produziu um aumento significativo na incidência de *ripples* no período D2-P4, em relação ao grupo SAL [SAL(D2-P4): -0,3341 (*zscore*) vs COCA-15(D2-P4): 1,426 (*zscore*); ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(24, 156) = 1,595$, $p = 0,0484$, teste *post hoc* de Tukey, SAL(D2-4) vs COCA-15(D2-P4); $p = 0,0068$]. Entretanto, nenhuma das doses de cocaína foi capaz de causar alterações significativas na incidência de *ripples* em nenhum dos 5 períodos do dia D3 ou nos outros períodos do dia D2.

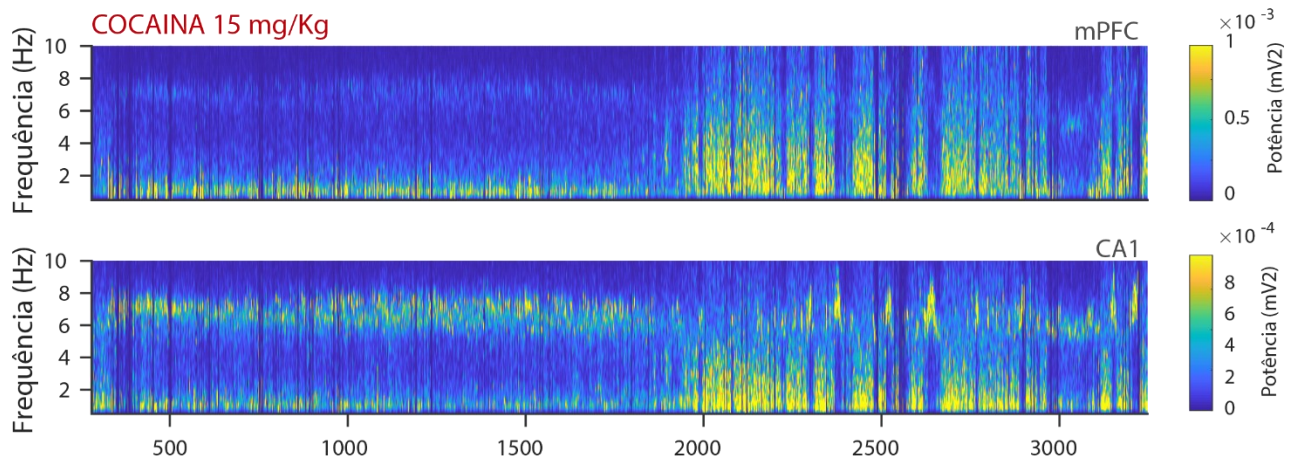
A



B



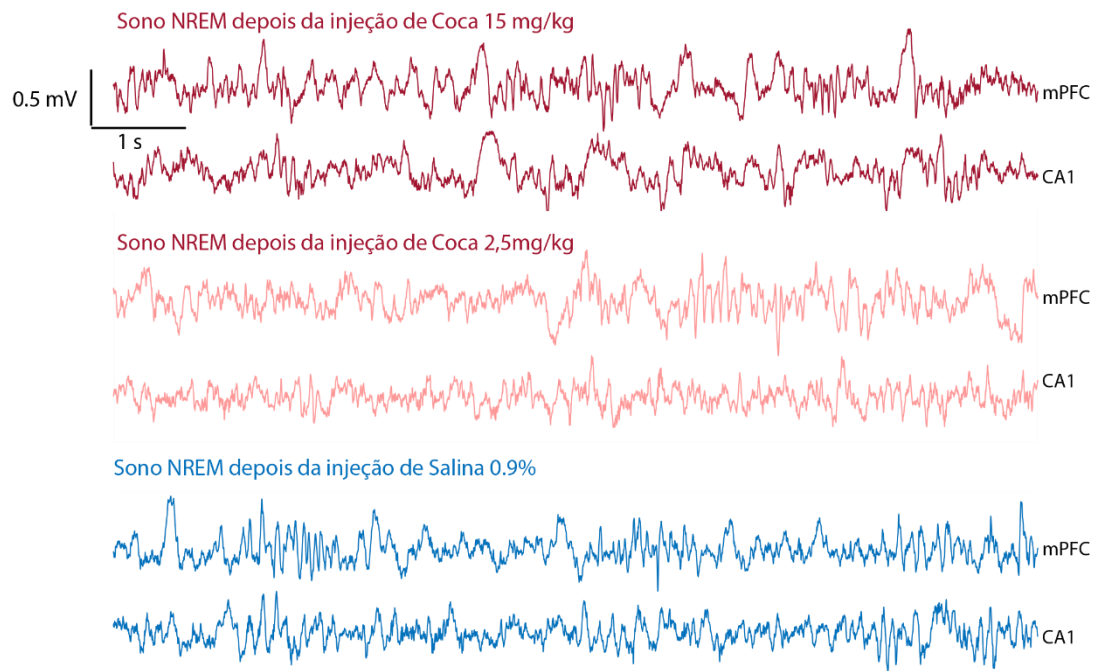
C



Tempo (Blocos de 10 s)

Figura 11. Ajuste homeostático induzido por oscilações Delta (1-4 Hz) no sono subsequente ao tratamento no dia 2 (D2). **A.** Exemplos representativos de espectrogramas dos registros de LFP do mPFC (painel superior) e CA1 (painel inferior) no D2 do grupo SAL. **B.** Exemplos representativos de espectrogramas dos registros de LFP do mPFC (painel superior) e CA1 (painel inferior) no D2 do grupo COCA-2,5. *Painel superior:* Espectrograma calculado a partir do mPFC. *Painel inferior:* Espectrograma calculado a partir de CA1. **C.** Exemplos representativos de espectrogramas dos registros de LFP do mPFC (painel superior) e CA1 (painel inferior) no D2 do grupo COCA-15. Os mesmos padrões da dinâmica de variação da potência de Delta são observados nesse caso. Porém, o rebote delta pode ser observado mais tardiamente (em torno da época 2000).

A



B

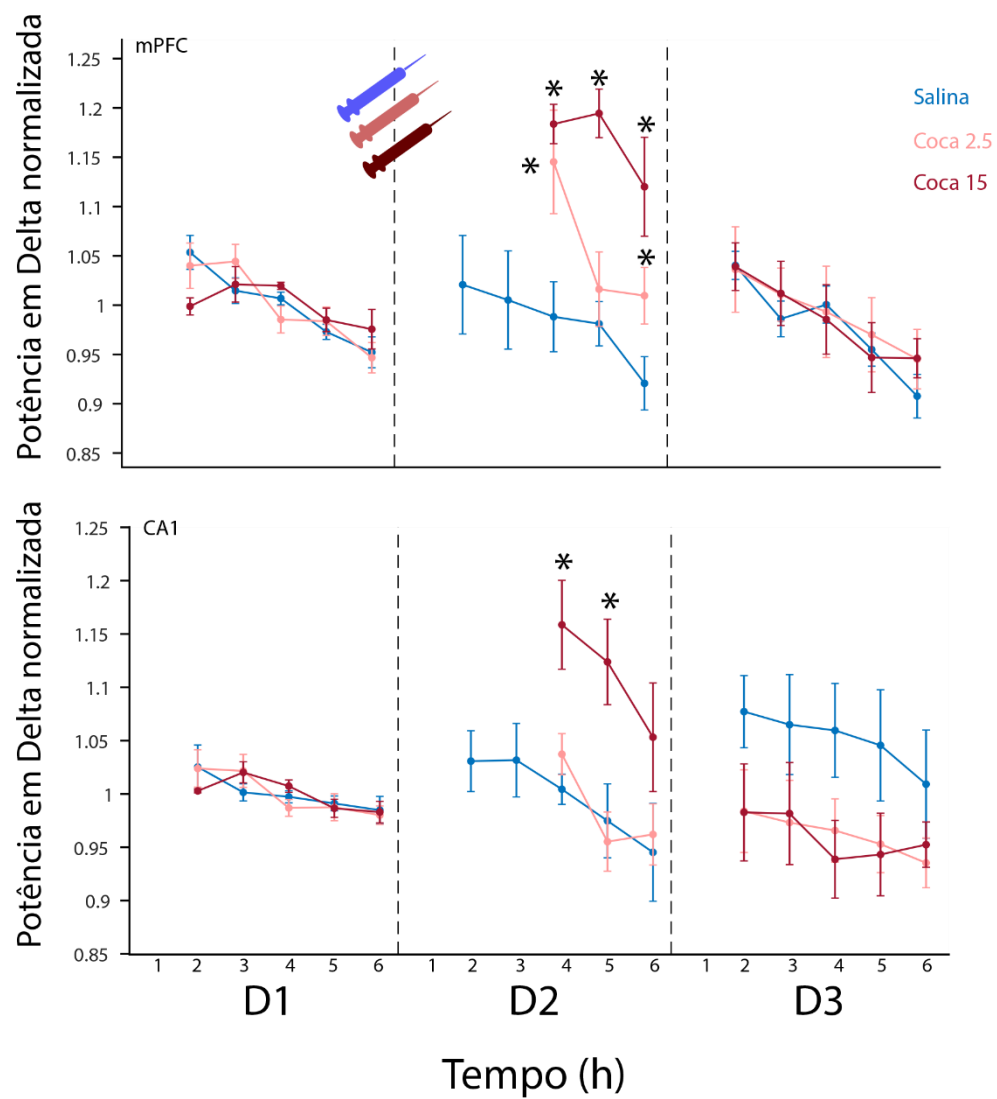


Figura 12. Alterações das potências de banda de frequência induzidas por cocaína no mPFC e CA1 nas épocas de sono NREM. A. Exemplos representativos de traçados de registros de LFP do mPFC e CA1 do D2 em nos primeiros períodos de sono NREM após tratamento. **B.** Potência média da banda de delta durante as épocas NREM ao longo dos dias de registro.

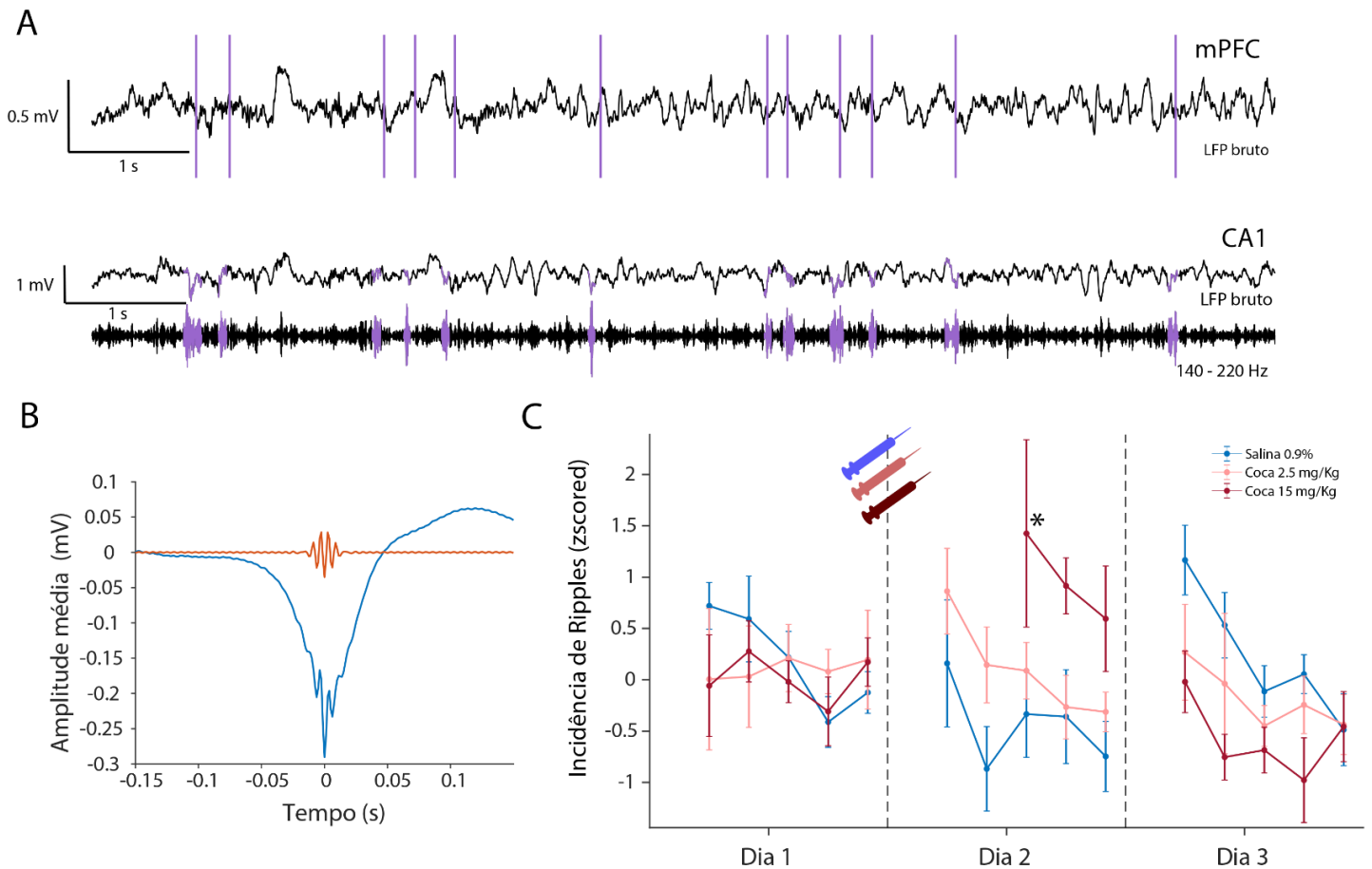


Figura 13. Alterações induzidas por cocaína na incidência de ripples hipocampais. A.

Exemplo representativo de traçados de registros de LFP do mPFC e CA1 de uma época NREM com alta incidência de ripples. *Painel superior:* registro de LFP do mPFC (sinal bruto, em preto). *Painel inferior:* registro bruto de LFP de CA1 (acima) e registro de LFP de CA1 filtrado na faixa 140-220 Hz (abaixo). Em ambos os traçados, os eventos de ripples são marcados em roxo. O traçado superior apresenta oscilações lentas, sincronizadas e de alta amplitude. Já o traçado inferior apresenta elevações de amplitude transientes, que marcam os eventos de ripples. **B.** Traçados das médias dos registros de potencial de campo em torno das ripples detectadas (150 ms antes e 150 ms após pico de amplitude do evento detectado). **C** - Incidência média de ripples ao longo dos dias D1-D3.

6.8 EFEITOS DA COCAÍNA SOBRE OSCILAÇÕES GAMA E HFO NO MPFC E CA1

DILGEN et al. 2013 demonstraram que a administração sistêmica aguda de cocaína eleva a potência de oscilações gama evocadas por estimulação optogenética de interneurônios de disparo rápido (FS) parvalbumina positivos do mPFC. A **figura 14** sintetiza os resultados referentes à avaliação da potência média das oscilações gama (70-90 Hz) e HFO (100-140 Hz) no mPFC e CA1. Ao contrário do que esperávamos, nenhuma das doses de cocaína foi capaz de causar alterações significativas sobre a magnitude da potência de gama em nos dias 1, 2 e 3 ($p > 0,05$).

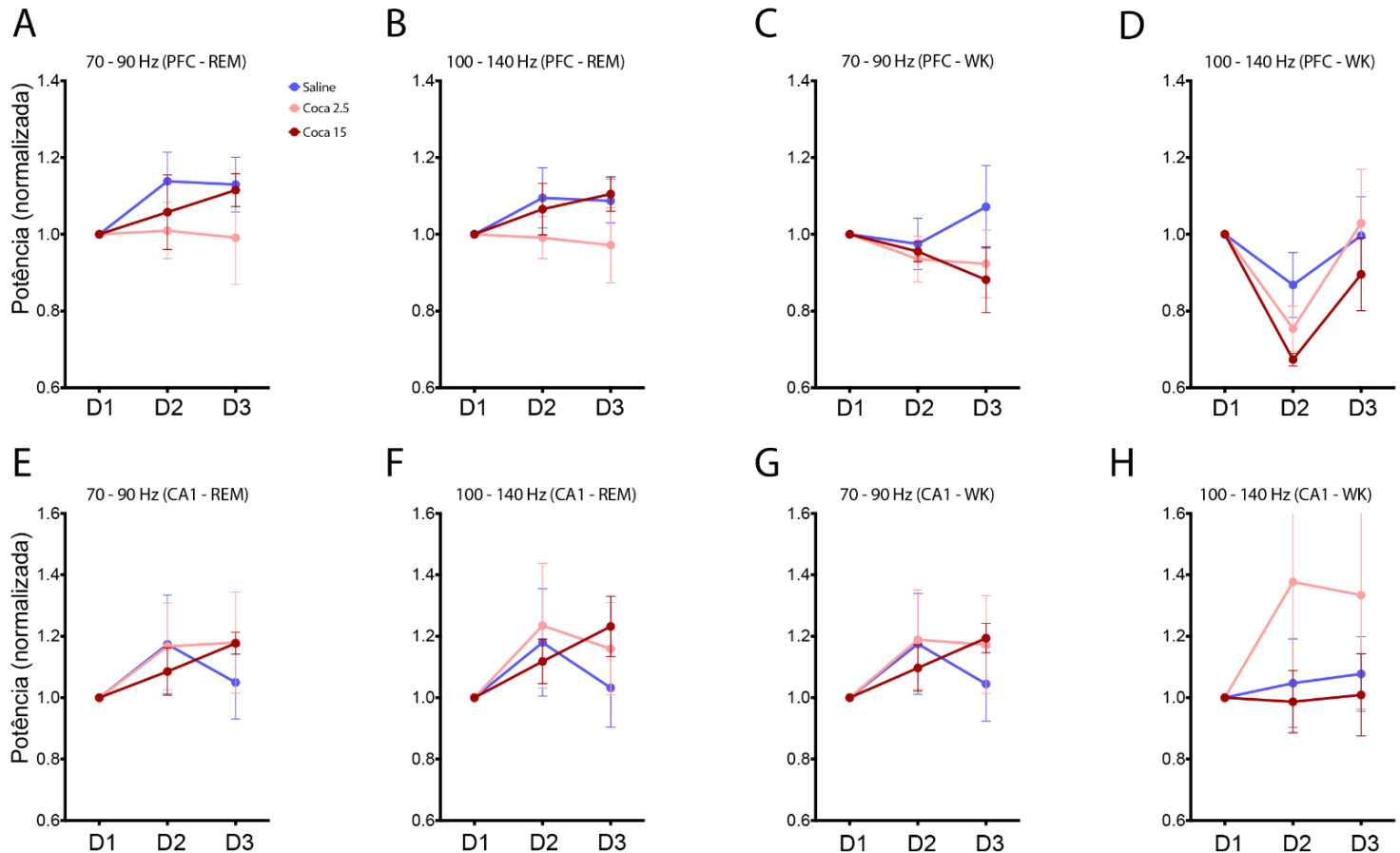


Figura 14. Potência média das bandas Gama (70-90 Hz) e HFO (100-140 Hz) ao longo dos dias D1-D3. As épocas de sono REM consideradas foram apenas aquelas do período da tarde de cada um dos dias. E as épocas WAKE consideradas foram apenas aquelas até 3 horas após início do registro (D1 e D3) e após tratamento (D2). **A** - Potência média da banda gama (70-90 Hz) durante as épocas de sono REM no mPFC ao longo dos dias. **B** - Potência média da banda HFO (100-140 Hz) durante as épocas de sono REM no mPFC ao longo dos dias. **C** - Potência média da banda gama (70-90 Hz) durante as épocas ACORDADO no mPFC ao longo dos dias. **D** - Potência média da banda HFO (100-140 Hz) durante as épocas ACORDADO no mPFC ao longo dos dias. **E** - Potência média da banda gama (70-90 Hz) durante as épocas de sono REM em CA1 ao longo dos dias. **F** - Potência média da banda HFO (100-140 Hz) durante as épocas de sono REM em CA1 ao longo dos dias. **G** - Potência média da banda gama (70-90 Hz) durante as épocas ACORDADO em CA1 ao longo dos dias. **H** - Potência média da banda HFO (100-140 Hz) durante as épocas ACORDADO em CA1 ao longo dos dias. Nenhuma das doses de cocaína foi capaz de causar alterações significativas na potência de Gama ou HFO durante os dias D2 ou D3. Todos os valores de potência foram normalizados pelos valores do dia D1. Todos os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média.

6.9 EFEITOS DA COCAÍNA SOBRE A MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS

A **figura 15-B** sintetiza os resultados referentes à avaliação da memória de localização de objetos. Nenhuma das doses de cocaína foi capaz de causar alterações significativas no índice de discriminação médio dos grupos experimentais em relação ao grupo SAL. A **figura 15-C** demonstra que as variáveis coerência média de Teta nas épocas ACORDADO e de sono REM do dia 2 não apresentam uma correlação significativa. Entretanto, a **figura 15-D** demonstra que as variáveis coerência média de Teta nas épocas ACORDADO do dia 3 e o índice de discriminação apresentam uma correlação significativa [$r(16) = 0.5$, $p = 0.04$], apesar desse resultado não se repetir para a correlação entre as variáveis coerência média de Teta nas épocas REM do dia 3.

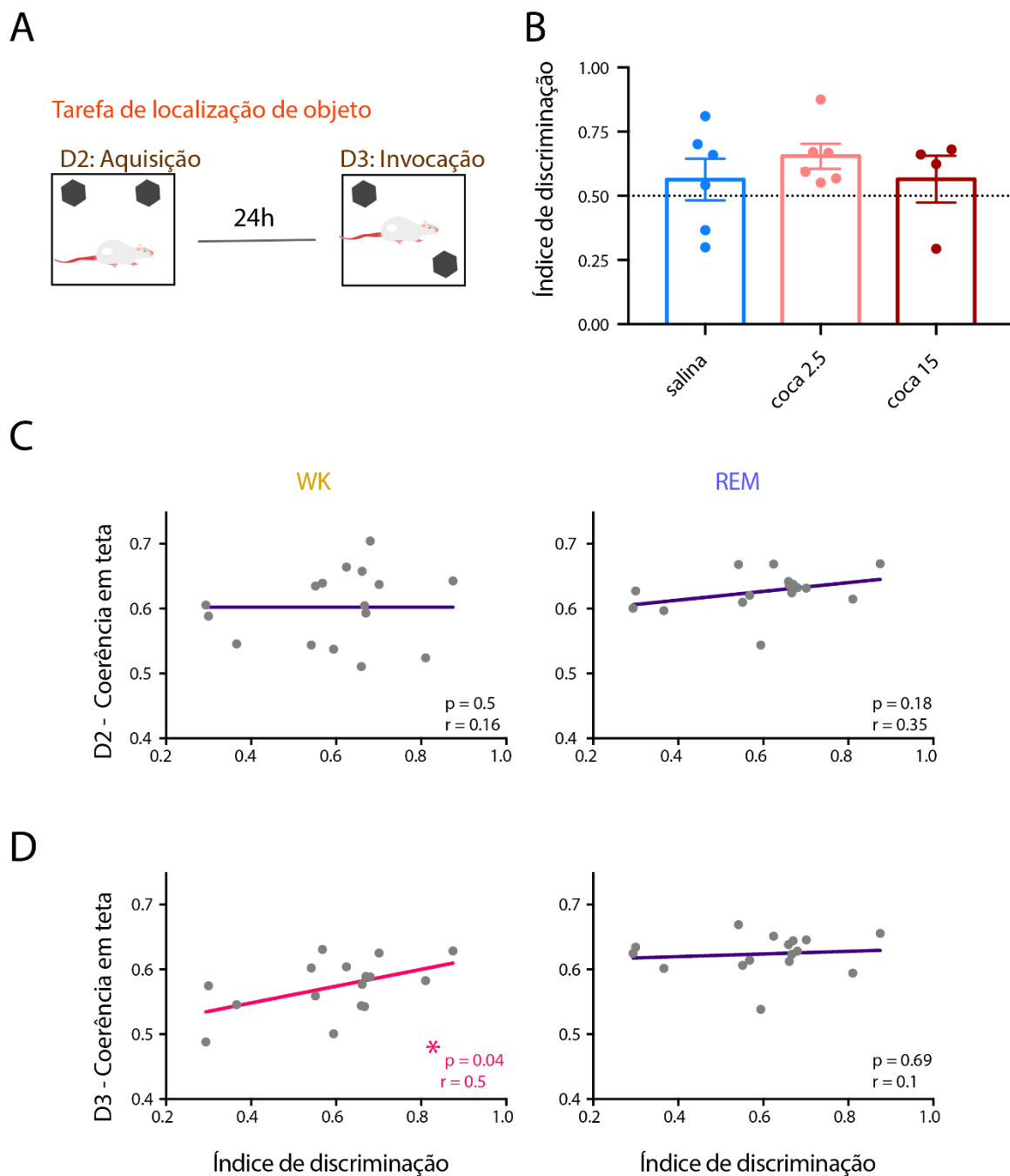


Figura 15. Tarefa de memória de localização de objeto. **A** - Planejamento da tarefa de memória de localização de objeto (MLO). No dia D2, os animais foram treinados na tarefa MLO. Após 24 horas, no dia D3, os animais foram submetidos ao teste de MLO. **B** - Índice de discriminação médio dos grupos. Nenhuma das doses de cocaína foi capaz de causar alterações significativas no índice de discriminação médio dos grupos experimentais em relação ao grupo SAL. Os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média. **C** - Correlação de Pearson para a coerência média de Teta (5-9 Hz) e o índice de discriminação de cada um dos animais no dia D2. *Painel a esquerda:* coerência média de Teta nas épocas ACORDADO. *Painel a direita:* coerência média de Teta nas épocas de sono REM. Não foram observadas correlações significativas entre as variáveis em nenhum dos casos. **D** - Correlação de Pearson para a coerência média de Teta (5-9 Hz) e o índice de discriminação de cada um dos animais no dia D3. *Painel a esquerda:* coerência média de Teta nas épocas ACORDADO. Nesse caso, foi observado que as variáveis coerência média de Teta e o índice de discriminação apresentam uma correlação significativa [$r(16) = 0.5$, $p = 0.04$]. *Painel a direita:* coerência média de Teta nas épocas de sono REM. Nesse caso, não foi observada uma correlação significativa entre

as variáveis. As épocas de sono REM foram apenas aquelas do período da tarde e as épocas ACORDADO foram apenas aquelas de até 3 horas após o início do registro (D1 e D3) e após tratamento (D2).

7. DISCUSSÃO

A cocaína é uma droga com grande potencial de abuso. Os mecanismos subjacentes a esta condição ainda são pouco compreendidos. Um acúmulo crescente de evidências tem indicado que a conectividade em regiões do circuito de recompensa, tais como mPFC, ATV, NAcc é alterada pela cocaína (CASTILLO DÍAZ et al., 2019; JENTSCH., et al, 2002). Além disso, a associação entre droga e contexto, um componente central do comportamento, relacionado a dependência, parece envolver o aumento do acoplamento entre NAcc e hipocampo (SJULSON., et al., 2018). Entretanto, ainda não se sabe como a cocaína afeta a conectividade na via CA1-mPFC e quão persistentes seriam estes efeitos após uma primeira exposição à droga, além de existir poucos trabalhos que utilizaram modelos agudos de cocaína. Tais informações parecem ser importantes para um melhor entendimento dos aspectos fisiológicos da dependência.

O objetivo deste trabalho foi investigar como a cocaína afeta os padrões oscilatórios e o acoplamento em redes hipocampo-fronto-corticais, a arquitetura do sono, e a memória em ratos. Além disso, examinamos como esses efeitos variam dependendo da dose, como por exemplo a variação do padrão dos estágios de sono observado por KNAPP., et al., 2007, ou nos efeitos de impulsividades em ratos demonstrado por DANDY & GATCH., 2013.

Demonstramos que **(1)** a cocaína é capaz de produzir um estado persistente de alerta, caracterizado por aumento na latência para início do sono e, consequentemente, diminuição do tempo despendido em sono NREM e REM e aumento na duração dos *bouts* do estado de vigília durante os períodos da manhã e tarde. Ainda, durante o estado acordado, **(2)** observamos um aumento sustentado da coerência entre CA1 e mPFC na banda de frequência teta (5-9 Hz) no grupo COCA-15e um aumento transitório no grupo COCA-2,5 em relação ao grupo controle, indicando um efeito dose-dependente. Durante as três primeiras horas após administração de cocaína na dose 15 mg/Kg, **(3)** verificamos uma redução do acoplamento entre a fase de teta e amplitude de gama rápida (100-140 Hz) em CA1. Além disso, **(4)** observamos um aumento da potência em delta (1-4 Hz) em CA1 e no mPFC durante o sono NREM posterior ao efeito de alerta inicial induzido pela cocaína no grupo COCA-15, em comparação ao grupo SAL. Curiosamente, o tratamento com COCA-2,5 induziu um aumento da potência em delta apenas no mPFC, mas não em CA1.

Ademais, associado ao efeito rebote da potência em delta, **(5)** verificamos um aumento na incidência de eventos de ripples hipocampais (140-220 Hz) no grupo COCA-15 mas não no grupo COCA-2,5. Apesar disso, não observamos efeitos significativos induzidos por COCA sobre a potência média das faixas de gama (70-90 Hz) ou HFO (100-140 Hz) ou sobre a consolidação de memória em tarefa MLO. Por fim, apesar dos diversos efeitos reportados, os parâmetros avaliados voltaram ao estado de linha de base 24 h após o tratamento.

Em relação ao aumento significativo da latência para início do sono induzido por cocaína, nossos achados estão consistentes com a literatura. BJORNESS & GREENE., 2018 também mostraram haver diferenças dose-dependentes sobre a latência para o início do sono. Ainda de acordo com estudos anteriores (HILL., MENDELSON., BERNSTEIN, 1977; BJORNESS & GREENE., 2018), não observamos diferenças significativas sobre a arquitetura do sono 24h depois do tratamento com cocaína. Em relação especificamente aos efeitos da cocaína sobre o sono REM, encontramos uma literatura mais controversa. Por exemplo, KNAPP., et al (2007) mostraram que ambos os tratamentos sistêmicos com cocaína nas doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg induziram diminuição da latência para o primeiro episódio de REM em ratos. Já a dose de 2,5 mg/kg mostrou ser suficiente para induzir um aumento do tempo despendido em sono REM 2 horas após tratamento. Por outro lado, BJORNESS & GREENE., 2018 mostraram que a latência para entrada em sono REM em camundongos aumentou após tratamento com cocaína nas doses de 9,6 mg/kg e 18 mg/kg. Já o tratamento com cocaína na dose de 3,6 mg/kg não produziu alterações na latência e tempo despendido em sono REM. Diferenças em fatores como tipo de sujeito experimental, horário tratamento, dose e método de classificação do sono podem explicar, pelo menos em parte, a divergência observada na literatura em relação aos efeitos da cocaína sobre o sono REM.

7.1 ACOPLAMENTO DE OSCILAÇÕES THETA ENTRE O HIPOCAMPO E MPFC

A comunicação entre hipocampo e mPFC parece ser essencial para processos de aprendizagem e consolidação de memória (SKELIN, KILIANSKI, MCNAUGHTON., 2019). BENCHENANE et al. 2010 demonstraram que a coerência em teta entre as regiões de CA1 e mPFC apresenta um aumento no ponto de decisão do labirinto em Y (antes da bifurcação dos braços), durante a aprendizagem de novas regras e principalmente quando os os animais aprendem a prever a localização de uma recompensa. Além disso, demonstraram o mesmo aumento da

coerência em teta através de infusão intra-cerebral de dopamina em animais anestesiados. Como foi visto anteriormente, a dopamina atua no circuito de recompensa, e participa do processo de adição da cocaína, além disso a dopamina tem efeitos na plasticidade sináptica (BENCHENANE et al. 2010; DRAKE & SCOTT, 2018). Após a aplicação da dopamina foi os autores observaram também um aumento da coerência em theta, semelhante ao observado na tarefa do labirinto em Y. A infusão intracerebral de dopamina apresenta ação semelhante ao aumento na disponibilidade de dopamina induzido por cocaína, apresentando, portanto, efeitos semelhantes na dinâmica de redes do sistema nervoso (DRAKE & SCOTT, 2018). Ademais, SJULSON., et al. 2018 demonstraram um aumento do acoplamento de oscilações entre hipocampo e *nucleus accumbens* durante o sono de animais. que passaram por teste de preferência condicionada por lugar (PCL) induzida por cocaína. Tais trabalhos apontam para a ideia de que a sinalização dopaminérgica é um fator importante para o aumento do acoplamento de oscilações entre o hipocampo e regiões corticais. Contudo, não se sabe quais são os efeitos da administração de cocaína e aumento da atividade dopaminérgica subsequente no acoplamento entre CA1 e mPFC. Neste estudo, demonstramos que a cocaína na dose 15 mg/kg é capaz de aumentar significativamente a coerência média em theta entre CA1 e mPFC durante o estado acordado das primeiras três horas após o tratamento. Estudos futuros são necessários para determinar a importância de tal aumento de coerência entre CA1 e mPFC em processos de associação entre contexto e cocaína.

7.2 ACOPLAMENTO FASE-AMPLITUDE ENTRE TETA E GAMA HIPOCAMPAL

Foi demonstrado recentemente que o acoplamento entre teta e gama apresenta-se aumentado durante tarefa de PCL induzida por heroína em ratos (ZHU et al. 2019). Os autores argumentam que tais alterações poderiam estar subjacentes ao desenvolvimento de dependência em heroína (ZHU et al. 2019). Neste estudo, observamos que o tratamento com cocaína 15 mg/kg foi capaz de diminuir o acoplamento entre teta e oscilações de alta frequência durante o estado acordado, sem produzir nenhum efeito subsequente durante sono REM. Até onde vai nosso conhecimento, os efeitos da cocaína sobre o acoplamento entre fase de teta e amplitude de gama ou de oscilações de alta frequência no hipocampo ainda não está descrito na literatura. ANDINO-PAVLOVSKY., et al. 2017 demonstraram que a indução da liberação de dopamina no mPFC produz aumento da comodulação entre delta e gama cortical em ratos. Nos próximos passos deste trabalho, testaremos a hipótese de que a diminuição do MI induzida por cocaína 15 mg/kg durante

estado acordado foi gerada por um deslocamento da frequência de fase moduladora de teta para delta.

Em termos funcionais, TORT, et al 2013 afirma que o papel fundamental da associação das oscilações de alta frequência (HFO- teta) ainda é pouco compreendido. TORT et al. 2008 mostrou que o acoplamento HFO-teta hipocampal aumentou durante o período de tomada de decisão em tarefa do labirinto em T. Segundo os autores, o contexto das mudanças na estabilização da CFC (*cross-frequency coupling*) no labirinto em T não puderam ser completamente explicadas por variações da amplitude de teta e pela velocidade da corrida no labirinto. Portanto, o aumento observado no acoplamento teta-HFO parece desempenhar um papel em certas funções cognitivas (TORT et al., 2008). Uma hipótese que emerge da combinação dos nossos achados com os de TORT et al 2008 seria de que a redução do acoplamento teta-HFO hipocampal poderia estar subjacente aos prejuízos de tomada de decisão observados em casos de dependência à cocaína (VANDAELE; VOUEILLAC-MENDOZA; AHMED, 2019; HOBKIRK, ANDRÉA L.,2019)

7.3 EFEITO REBOTE DE ONDAS DELTA E INCIDÊNCIA RIPPLES HIPOCAMPAIS

De acordo com a hipótese do ajuste homeostático (TONONI, G. CIRELLI, 2014) o fortalecimento de conexões sinápticas induzido pelos períodos de vigília é seletivamente revertido durante o sono, restaurando a homeostase sináptica. Tal processo é marcado por oscilações Delta de alta amplitude, que decaem ao longo do período de sono. Ainda, de acordo com TONONI E CIRELLI, 2014, tal mecanismo explica os benefícios do sono na aquisição e consolidação de memórias. Ademais acredita-se que as ripples estão envolvidas em alterações sinápticas e promovem a consolidação de traços de memória (BUZSÁKI et al., 1987). Além disso, acredita-se que tal consolidação de traços de memória mediada pelas *ripples* ocorre durante o sono NREM, quando memórias hipocampais transientes são transferidas e consolidadas em regiões neocorticais (BUZSÁKI et al., 1989).

Como descrito por PONOMARENKO et al. 2003, o aumento do tempo despendido em alerta induzido por tratamento agudo com anfetamina é responsável por um aumento na potência delta em CA1 e uma maior incidência de ripples hipocampais durante o sono NREM após o estado de alerta. Considerando que tal efeito rebote pode ser relevante para o processo de formação de memórias de associação entre droga e contexto, nosso estudo investigou se a cocaína também seria capaz de produzir tal fenômeno adaptativo.

De forma semelhante, o presente trabalho demonstrou que após o período de alerta induzida por administração aguda de cocaína, há um aumento na potência de Delta no mPFC e CA1 associado ao aumento na incidência de ripples hipocampais. De acordo com os resultados de SJULSON et al. 2018, a potenciação sináptica no nucleus accumbens causada pela administração repetida de cocaína afeta preferencialmente regiões eferentes ativas durante a exposição à droga, como as próprias *place cells* hipocampais, durante a tarefa de CPP. Portanto, o rebote de ripples durante o sono subsequente à administração de cocaína poderia ser uma janela temporal para a consolidação da memória associativa da droga com o contexto, envolvendo a coordenação entre CA1 e PFC.

7.4 OSCILAÇÕES GAMA

DILGEN et al. 2013 demonstraram que a administração sistêmica aguda de cocaína eleva a potência de oscilações gama evocadas por estimulação optogenética de interneurônios de disparo rápido (FS) parvalbumina positivos do mPFC. Ademais, sabe-se que interneurônios GABAérgicos são essenciais para o surgimento de redes de oscilação em gama, nas quais eles sincronizam o padrão de disparos de células piramidais (MANN., RADCLIFFE., PAULSEN. 2005). Por fim, Tierney et al. 2008, mostrou que a dopamina possui um efeito redutor na taxa de disparo espontânea de neurônios do mPFC. Portanto, espera-se que a administração aguda de cocaína altere a potência média da banda gama. Contudo, apesar das evidências existentes, no presente estudo, nenhuma das doses de cocaína foi capaz de induzir alterações na potência média de gama no mPFC ou CA1. Tal discrepância com a literatura pode ser explicada pelo fato de que nosso estudo avaliou apenas a atividade oscilatória espontânea de gama e não a atividade de gama induzida por estimulação optogenética como feito por DILGEN et al. 2013. Além disso, é possível que administração sistêmica de cocaína possa não ser suficiente para sustentar alterações na taxa de disparos de interneurônios, como proposto por TIERNEY et al. 2008. Também devemos considerar que o número baixo de sujeitos no grupo cocaína 15 mg/kg pode ter mascarado alguma possível diferença. Nos próximos passos, ampliaremos nosso número amostral.

7.5 RECONHECIMENTO DA LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS E SUA RELAÇÃO COM O ACOPLAMENTO EM TETA

Por fim, avaliamos a possível relevância funcional dos nossos achados eletrofisiológicos utilizando a tarefa de localização de objetos. Considerando os efeitos descritos anteriormente de diferentes doses de cocaína sobre o sono REM, nós formulamos a hipótese de que COCA 2,5 seria capaz melhorar a consolidação de memória, enquanto COCA-15 prejudicaria. Para isso, submetemos os animais do grupo COCA-2,5 a apenas 3 minutos de treino e os grupos SALINA e COCA-15 a 20 min. Se COCA-2,5, de fato, fosse capaz de melhorar algum processo de consolidação de memória, a média dos índices de discriminação de objetos deste grupo deveria atingir níveis semelhantes aos do grupo controle. Já o grupo COCA-15, deveria apresentar uma média significativamente menor que o grupo SAL. Nossos resultados mostraram que nenhuma das doses de cocaína foi capaz de causar alterações significativas no índice de discriminação médio dos grupos experimentais em relação ao grupo Salina. A ausência de efeitos da COCA-15 parece estar de acordo com o trabalho de JENTSCH, J. DAVID et al., 2002, que demonstrou em uma tarefa com primatas, que a dose aguda de cocaína (1 mg/kg; 20 minutos antes do teste) prejudicou o treino reverso de um objeto treinado previamente, mas não apresentou nenhum efeito sob um novo objeto apresentado. Já em relação ao grupo COCA-2,5, estão em andamento experimentos adicionais para incluirmos o grupo SALINA (3min) no trabalho. Isso nos permitirá extrair conclusões mais seguras sobre o possível papel facilitador de memória da cocaína na dose de 2,5 mg/kg.

7.6 OSCILAÇÕES DELTA

Como foi observado aqui, houve um aumento de delta, em ambas as áreas CA1-mPFC. Um dos marcadores da necessidade do sono é a quantidade de ondas lentas (0.5-4.5 Hz) presentes no sono NREM (TONONI, CIRELLI, 2019). Essa atividade de ondas lentas é mais alta no início do sono, e aumenta quanto mais tempo o animal passar acordado, ou realizar uma tarefa, ou ainda após o contato com um ambiente com estímulos novos, e esse período de sono NREM diminui com o aumento do tempo gasto dormindo. Isso é caracterizado por um estado alternado de disparo e silêncio neuronal e isso acontece quando um número específico de células neuronais tem atividade síncrona (TONONI, CIRELLI, 2019).

O aumento de delta (1-4 Hz) visto na **figura 11**, mostra como essas faixas de oscilações ficam alteradas de maneira dose-dependente. No animal salina há uma intercalação de estados do sono de maneira que, essa diminuição de delta, é marcada pela diminuição de NREM, que é substituído por épocas de vigília e sono REM. Com o tratamento com a cocaína e de acordo com tempo em que o animal passa acordado, o aumento ocorrido posteriormente de delta é se apresenta de maneira mais tardia no grupo COCA-15, do que na COCA-2,5, e esse aumento é descrito por (TONONI & CIRELI,2014), e representa um processo de homeostase sináptica.

Além disso, FUNK, C. M., et al, 2016 mostrou dados sobre as ondas lentas em todos os estados do ciclo sono vigília, incluindo o REM, nesse trabalho eles apresentaram dados sobre a função dessa faixa no desacoplamento sensorial, os dados do estudo mostraram que ondas lentas locais podem aparecer em diversas regiões corticais de roedores, e no sono REM as ondas lentas ocorrem apenas áreas motoras e sensorial primárias, mostrando que elas são responsáveis pela desconexão com o ambiente externo.

Por fim vale ressaltar mais uma vez, o estudo de MAINGRET, et al., 2016, que mostrou através de estimulação, induzindo ondas deltas e *spindles*, um aumento da resposta da área pré-frontal à tarefa, e do alto desempenho na realização da segunda parte da tarefa, realizada no dia seguinte, o que corrobora com a hipótese da faixa de delta ser atribuída também aos processo de consolidação de memória.

O aumento de delta (1-4 Hz), como demonstrado aqui neste estudo, na dose menor, mostrou apenas aumento de delta na região de mPFC, o que poderia representar uma alteração como a descrita por MAINGRET, et al., 2016, que estimulou áreas corticais para a propagação de delta.

7.6 CONCLUSÕES E DIREÇÕES FUTURAS

Neste estudo, demonstramos que a cocaína é capaz de afetar padrões oscilatórios além de afetar a coordenação entre CA1 e mPFC de forma dose-dependente e transitória, será necessário a realização de um novo teste de localização de objetos para que possamos melhorar a compreensão acerca da formação de memórias relacionadas a localização de objeto, e melhorar nossos resultados. Os próximos passos envolverão, a avaliação dos efeitos da cocaína sobre: (1) a

coerência de fase hipocampo-mPFC; (2) comodulação Delta-gamma; (3) alterações comportamentais mais sutis, como manifestação de estereotipias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT A. Neuroscience: while you were sleeping. **Nature**.2005, 437:1220–1222.

ADLER CH. Nonmotor complications in Parkinson's disease. **Movement Disorders**. 2005, 20: S23–S29.

ANDINO-PAVLOVSKY V., et al. Dopamine modulates delta-gamma phase-amplitude coupling in the prefrontal cortex of behaving rats. **Frontiers Neural Circuits**. 2017.

ASTON-JONES G, BLOOM FE. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. **The Journal of Neuroscience**. 1981, 1:876–886.

AXMACHER N., et al. Cross-frequency coupling supports multi-item working memory in the human hippocampus. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2010;107(7):3228–33.

BENCHENANE K, ET AL. Coherent Theta Oscillations and Reorganization of Spike Timing in the Hippocampal- Prefrontal Network upon Learning. **Neuron**. 2010;66(6):921–36.

BERKE J. What does dopamine mean? Is dopamine a signal for learning, for motivation, or both? **Nature Neuroscience**. 2018;21(6):787–93.

BJORNESS TE, GREENE RW. Dose response of acute cocaine on sleep/waking behavior in mice. **Neurobiology Sleep Circadian Rhythm** [Internet]. 2018;5(February):84–93.

BRADBERRY CW. Dynamics of extracellular dopamine in the acute and chronic actions of cocaine. **Neuroscientist**. 2002;8(4):315–22.

BUZSÁKI, G. (1989) Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states. **Neuroscience** 31:551

BUZSÁKI, G, WATSON, B. Brain rhythms and neural syntax: Implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. **Dialogues Clinical Neuroscience**. 2012;14(4):345–67.

BUZSÁKI G, HAAS HL, ANDERSON EG. Long-term potentiation induced by physiologically relevant stimulus patterns. **Brain Research**. 1987;435(1–2):331–3. –570

BUZSÁKI, GYÖRGY. Rhythms of the Brain. **New York: Oxford University Press**; 2006.

BUZSÁKI, et al. Brain Size, Keeping Timing: Evolutionary Preservation of Brain Rhythms. **Neuron**. 2013;23(1):1–7.

BUZSÁKI, GYÖRGY.; XIAO-JING, W. Mechanisms of Gamma Oscillations. **Annual Review of Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 2166–2171, 2012.

CANTERO JL., et al. Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex. **Journal Neuroscience**. 2003, 23:10897–10903.

CANOLTY, RYAN T. CANOLTY. Knight RT. The functional role of cross-frequency coupling Ryan. **Trends Cognitive Science**. 2010;14(11):506–15.

CASTILLO DÍAZ, F. et al. Dopamine Neurotransmission in the Ventral Tegmental Area Promotes Active Forgetting of Cocaine-Associated Memory. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 9, p. 6206–6217, 2019.

CLIFFORD M K, SUBIMAL D, DOMENIC A C, CK. Effects of low dose cocaine on REM sleep in the freely moving rat. **Sleep and Biological Rhythms** 2007 January; 5(1) 55–62 Eff. 2007;5(1):55–62.

COLE R. SCOTT, VOYTEK, BRADLEE. Brain Oscillation and the Importance of Waveform Shape. **Trends in cognitive Sciences**. 2017.

COLGIN, LAURA LEE. Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony. **Current Opinion in Neurobiology**. 2013

CROCQ, M. A. Historical and cultural aspects of man's relationship with addictive drugs. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 355–361, 2007.

DACKIS, C. A. et al. Cocaine dependence: a disease of the brain 's reward centers. **Journal of Substance Abuse Treatment**. v. 21, p. 111–117, 2001.

DILGEN, J. E. et al. Optogenetically evoked gamma oscillations are disturbed by cocaine administration. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. NOV, p. 1–9, 2013.

DUGOVIC C., et al. Alterations in rats following chronic cocaine treatment. **Psychopharmacology**. 1992;263–70.

DRAKE R L, SCOTT H J P. Dark classics in Chemical Neuroscience: Cocaine. **ACS Chemical Neuroscience**. 2018

DZIRASA K. et al. Dopaminergic Control of Sleep-Wake States. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 41, p. 10577–10589, 2006.

EARLEY P. H. (1991). The cocaine recovery book. London: **Sage Publications**.

ESPANA RA, SCAMMELL TE. Sleep neurobiology for the clinician. **Sleep**. 2004, 27:811–820.

ESCHENKO O, RAMADAN W, MÖLLE M, BORN J, SARA SJ. Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. **Learning Memory**. 2008;15(4):222–8.

EVANS EB, WENGER GR. Effects of drugs of abuse on acquisition of behavioral chains in squirrel monkeys. **Psychopharmacology** .1992;107(1):55–60.

FRANKLIN., et al. Structural and functional analyses of brain substrates involved in cue-induced cocaine craving. **Society for Neuroscience Abstracts**, 26, 1313. 2001

FUNK C. M., et al. Local Slow Waves in Superficial Layers of Primary Cortical Areas during REM Sleep. **Current Biology**, 26(3), 396–403. 2016.

GAGNON JF., et al. REM sleep behavior disorder and REM sleep without atonia in Parkinson's disease. **Neurology**. 2002, 59:585–589.

HARRIS BOZER AL., et al. Local field potentials in the ventral tegmental area during cocaine-induced locomotor activation: Measurements in freely moving rats. **Brain Research Bulletin** [Internet]. 2016.

HERRERAS, O. Local field potentials: Myths and misunderstandings. **Frontiers Neural Circuits**. 2016;10(DEC):1–16.

HILL SY, MENDELSON WB, BERNSTEIN DA. Cocaine effects on sleep parameters in the rat. **Psychopharmacology**. 1977;51(2):125–7.

HOBKIRK., et al. Reward and executive control network resting-state functional connectivity is associated with impulsivity during reward-based decision making for cocaine users. **Drug and Alcohol Dependence**. 2019;194(01):32–9.

HOBSON JA., et al. Acetylcholine as a brain state modulator—triggering and long-term regulation of REM sleep. In: Cholinergic function and dysfunction. **Progress in Brain Research**. 1993, pp 389–404.

HOBSON JA., STICKGOLD R., PACE-SCHOTT EF. The neuropsychology of REM sleep dreaming. **NeuroReport**.1998 9:R1–R14.

HYAFIL A., et al. Speech encoding by coupled cortical theta and gamma oscillations. **Elife** 2015;1–23.

PACE-SCHOTT EF., HOBSON JA. The neurobiology of sleep: Genetics, cellular physiology and subcortical networks. **Nature Reviews Neuroscience**. 2002;3(8):591–605

IKEMOTO S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory. **Behavioral Neuroscience Research Branch**, v. 35, n. 1, p. 129–150, 2010.

JAY TM, WITTER MP. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. **The Journal of Comparative Neurology**.1991.

JENSEN O, COLGIN LL. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. **Trends of Cognition Science**. 2007;11(7):7–9.

JENTSCH JD., et al. Impairments of Reversal Learning and Response Perseveration after Repeated, Intermittent Cocaine Administrations to Monkeys. **Neuropsychopharmacology** 2002.

JIRSA V, MÜLLER V. Cross-frequency coupling in real and virtual brain networks. **Frontiers in Computational Neuroscience** .2013.

JOHN J., et al. Cataplexy active neurons in the hypothalamus: implications for the role of histamine in sleep and waking behavior. **Neuron**. 2004, 42:619–634.

KNAPP, CLIFFORD M; et al. Effects of low dose cocaine on REM sleep in the freely moving rat. **Sleep Biological Rhythms**. January; 5(1): 55–62. Effects, v. 5, n. 1, p. 55–62, 2007.

LIN L., et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. **Cell**. 1999, 98:365–376.

LOGAN R. W.; WILLIAMS, W. P.; MCCLUNG, C. A. Circadian rhythms and addiction: Mechanistic insights and future directions. **Behavioral Neuroscience**, v. 128, n. 3, p. 387–412, 2014.

MAGGINI C., et al. REM latency in psychiatric disorders: polygraphic study on major depression, bipolar disorder-manic, and schizophrenic disorder. **New Trends in Experimental and Clinical Psychiatry**, 1988, 2:93–101.

MAINGRET N., et al. Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 959-964, 2016.

MANN E O, RADCLIFFE C.A, PAULSEN O. Hippocampal gamma-frequency oscillations: from interneurons to pyramidal cells, and back. **The Journal of Physiology**. 2005.

MATTSON BJ., et al. Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. **European Journal of Neuroscience**. 2008.

MILLS F., et al. Cadherins mediate cocaine-induced synaptic plasticity and behavioral conditioning. **Nature Neuroscience**. v. 20, n. 4, p. 540–549, 2017.

MIYAWAKI H. DIBA K. Regulation of Hippocampal Firing by Network Oscillations during Sleep. **Current Biology**, v. 26, n. 7, p. 893–902, 2016.

NATHANSON J A., et al. (1993). Cocaine as a naturally occurring insecticide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 90 (20), 9645–9648.

NESTLER E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature reviews Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 119–28, 2001.

NESTLER E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nature reviews Neuroscience**, v.14, n.9; 2013.

NESTLER E. J. The neurobiology of cocaine addiction. **Science & Practice Perspectives**, v.3, n.1, p.4-10; 2005.

NORMAN K A. How hippocampus and cortex contribute to recognition memory: Revisiting the Complementary Learning Systems model Kenneth. **Hippocampus**. 2010;20(11):1217–27.

O'BRIEN LM., et al. Sleep disturbances in children with attention deficit hyperactivity disorder. **Pediatric Research**. 2003.

O'DONNELL P. Dopamine gating of forebrain neural ensembles. **European Journal of Neuroscience**. 2003.

OPRISAN S. A. et al. Cocaine-induced changes in low-dimensional attractors of local field potentials in optogenetic mice. **Frontiers in Computational Neuroscience**, v. 12, n. January, p. 1–16, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE: Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10: Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas. Tradução: Dorgival Caetano, 1ªed. Porto Alegre: **Artes Médicas**, 69-82, 1993.

ORSINI CA., et al. Functional connectivity of chronic cocaine use reveals progressive neuroadaptations in neocortical, striatal, and limbic networks. **eNeuro**. 2018;5(4).

PACE-SCHOTT EF., HOBSON JA. The neurobiology of sleep: Genetics, cellular physiology and subcortical networks. **Nature reviews Neuroscience**. 2002.

PAXINOS G, WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press, San Diego**, 2017.

PAXINOS J, WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, 1998.

PENNARTZ CM, GROENEWEGER HJ, LOPES DA SILVA FH. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. **Progress in Neurobiology**. 1994, 42(6);719-61.

PONOMARENKO AA, LIN JS, SELBACH O, HAAS HL. Temporal pattern of hippocampal high-frequency oscillations during sleep after stimulant-evoked waking. **Neuroscience**. 2003;121(3):759–69.

PROJETO DE LEI 7.663/10. Acrescenta e altera dispositivos à Lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006. Acesso em 10/04/2013.

RASCH, B, BORN, J. About Sleep's Role in Memory. **Physiology Review**. 2013

Ellenbogen Jeffrey M, Payne Jessica D, Stickgold, Robert. The Role of Sleep in Declarative Memory Consolidation: Passive, Permissive, Active or None? **Current Opinion in Neurobiology**. 2006.

RUSSO S J, NESTLER E.J. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nature Review Neuroscience** v.14, n.9, p.609-25, 2013.

SARTI F, BORGLAND SL, KHARAZIA VN, BONCI A. Acute cocaine exposure alters spine density and long-term potentiation in the ventral tegmental area. **European Journal of Neuroscience**. 2007;26(3):749–56.

SCHULTZ W, DAYAN P, MONTAGUE PR. A neural substrate of prediction and reward. **Science** (80-). 1997;275(5306):1593–9.

SIAPAS, ATHANASSIOS G, WILSON, MATTHEW A. Coordinated Interactions Between Hippocampal Ripples and Cortical Spindles During Slow-Wave Sleep. **Neuron**. 1998.

SIROTA., et al. Communication Between Neocortex and Hippocampus During Sleep in Rodents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2003.

SKELIN I, KILIANSKI S, MCNAUGHTON BL. Hippocampal coupling with cortical and subcortical structures in the context of memory consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**. 2019.

SJULSON L et al. Cocaine Place Conditioning Strengthens Location-Specific Hippocampal coupling to the nucleus accumbens. **Neuron**. 2018.

STERIADE M., MCCORMICK DA, SEJNOWSKI TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. **Science** 262:679–685.

SULLIVAN D., et al. Comparison of sleep spindles and theta oscillations in the hippocampus. **Journal Neuroscience**. 2014;34(2):662–74.

TIERNEY P L., et al. Dopamine Modulates Temporal Dynamics of Feedforward Inhibition in Rat Prefrontal Cortex In Vivo, **Cerebral Cortex**, Volume 18, Issue 10, October 2008, Pages 2251–2262

TIMO-IARIA C., et al. Phases and states of sleep in the rat. **Physiology Behavior**. 1970, 5:1057–1062.

TONONI G.; CIRELLI C. Sleep and synaptic down-selection. **European Journal of Neuroscience**, n. June 2018, p. 1–9, 2019.

TONONI G, CIRELLI C. Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic to cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. **Neuron**. 2014.

TORT, ADRIANO B L et al. “Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task.” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** vol. 105,51 .2008.

TORT, A. B. et al. Measuring phase-amplitude between neuronal oscillations of different frequencies. **Journal Neurophysiology**, v. 104, n. 2, p. 1195-210, Aug 2010.

TORT ABL., et al. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. 2009.

TORT, AB., et al. Theta-associated high-frequency oscillations (110-160Hz) in the hippocampus and neocortex. **Progress in Neurobiology**. 2013.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. World Drug Report: Chapter 1. Cocaine. **United Nations publication** p. 35–42, 2016.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. Drugs and age. **United Nations publication**, Sales No. E.19.XI.8, 2018.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. Global overview of drug demand and supply. **United Nations publication**, Sales No. E.18.XI.9, 2017.

VANDAELE, Y., VOUILLAC-MENDOZA C., AHMED SH. Inflexible habitual decision-making during choice between cocaine and a nondrug alternative. **Translational Psychiatry**. 2019.

VANDERWOLF CH. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. Electroencephalogram. **Clinical Neurophysiology**. 1969, 26:407–418.

VOLKOW N D, JOANNA S F. Addiction, a Disease of Compulsion and Drive: Involvement of the Orbitofrontal Cortex. **Cerebral Cortex**. 2000.

WANG D Q., et al. Effects of chronic cocaine exposure on the circadian rhythmic expression of the clock genes in reward-related brain areas in rats. **Behavioral Brain Research**, v. 363, n. December 2018, p. 61–69, 2019.

WARBURTON E C, BROWN M W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behav Brain Res**. 2015 May 15; 285: 131–139.

WATSON B, BUZSÁKI G. Sleep, memory and brain rhythms. **Daedalus**, 2013;142(3):26–47.

YOU Z B, CHEN Y Q, WISE, R. A. Dopamine and glutamate release in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat following lateral hypothalamic self-stimulation. **Neuroscience**, 2001.

ZENKE F, GERSTNER W. Hebbian plasticity requires compensatory processes on multiple timescales. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2017.

ZHU Z., et al. Theta-gamma coupling in the prelimbic area is associated with heroin addiction. **Neuroscience Letters**. 2019

9. ANEXO

Figura-6

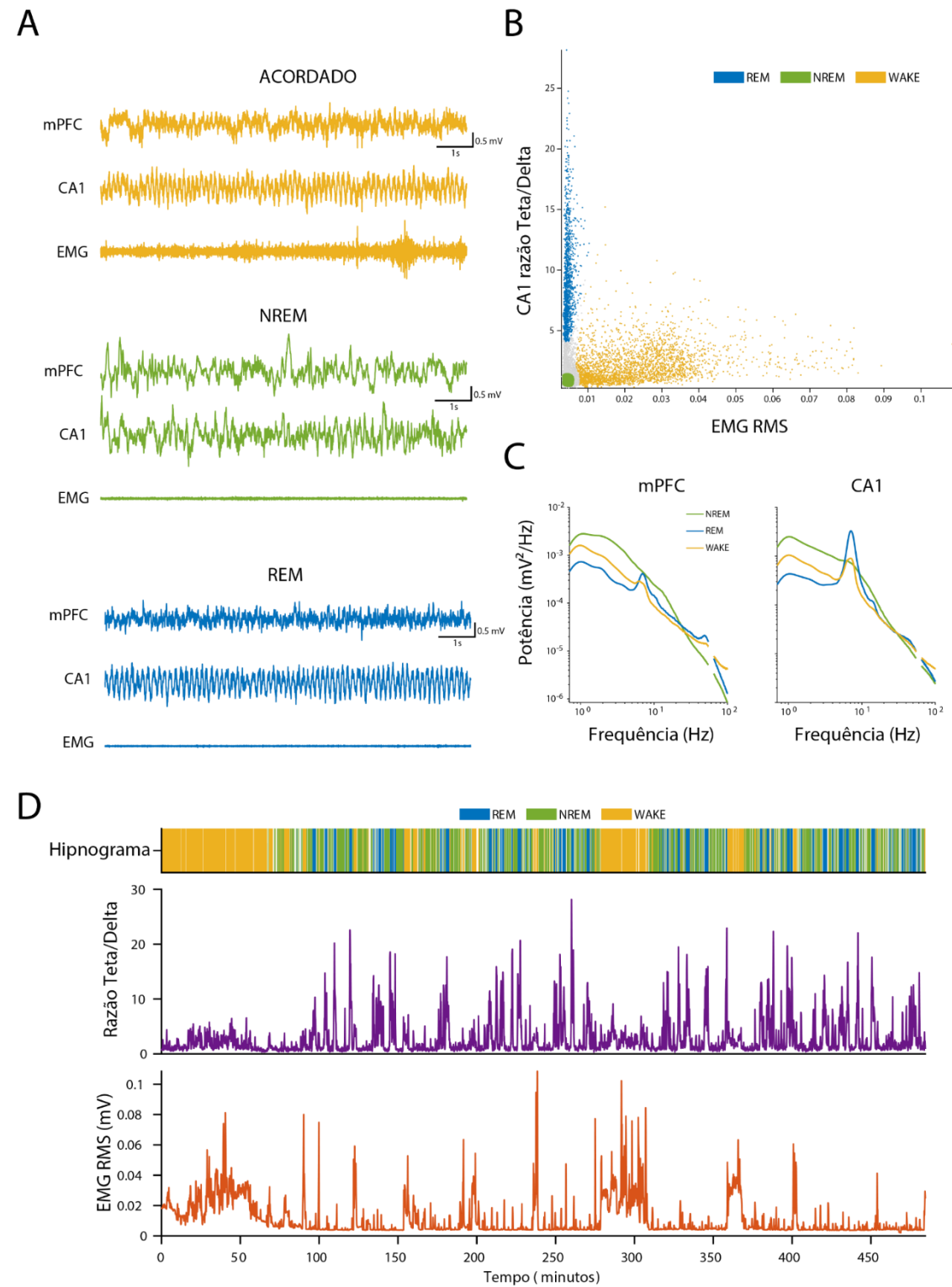


Figura 6. Classificação dos estágios do ciclo sono-vigília. **A.** Exemplos de traçados representativos de LFP (mPFC e CA1) e EMG para cada um dos estágios do ciclo sono-vigília. **B.** Exemplo de clusterização realizada utilizando o modelo de distribuição de mistura gaussiana (*GM Model*). As variáveis utilizadas para gerar o modelo são expressas nos eixos (razão Teta/Delta de CA1 e o RMS do EMG). **C.** Exemplos representativos de densidade espectral de potência média dos registros de LFP do mPFC e CA1. As linhas amarelas representam a densidade espectral de potência média das épocas de vigília (ACORDADO), as linhas verdes representam as épocas de sono NREM e as linhas azuis representam as épocas de sono REM. A faixa de 55-65 Hz foi suprimida devido a possível contaminação do registro por ruído de 60 Hz proveniente de fontes externas. *Painel à esquerda:* no mPFC, há uma predominância de componentes de baixa frequência (< 4 Hz) na média das épocas dos três estágios. Porém, há um pico na faixa correspondente a Teta (aproximadamente, 5-9 Hz) na média das épocas de sono REM e um reduzido aumento de potência na mesma faixa de frequência na média das épocas ACORDADO. *Painel à direita:* em CA1, há uma predominância de componentes de baixa frequência (< 4 Hz) na média das épocas NREM. Há, entretanto, um pico na faixa correspondente a Teta (aproximadamente, 5-9 Hz) na média das épocas de sono REM e um reduzido aumento de potência na mesma faixa de frequência na média das épocas ACORDADO, ambos proporcionalmente mais elevados se comparados ao mPFC. **D** - Exemplo representativo de hipnograma e relação com a razão Teta/Delta obtida a partir da análise do LFP do hipocampo e RMS do EMG ao longo do tempo. Os traços verticais no hipnograma representam a classificação de cada uma das épocas de 10 segundos consecutivas dos registros eletrofisiológicos. Quanto mais espesso o traço vertical de uma única cor, maior o número de épocas consecutivas de um mesmo estágio do ciclo sono-vigília. Os traços amarelos representam épocas ACORDADO, os traços verdes, épocas NREM e os traços azuis, épocas REM. Os espaços em branco representam épocas excluídas devido a presença de artefatos ou épocas não classificados. O traçado roxo representa a variação da razão Teta/Delta hipocampal ao longo do tempo, apresentando um valor para cada época de 10 segundos. As épocas REM apresentam altos valores de razão Teta/Delta, em contraste com as épocas NREM e ACORDADO, com baixos valores de razão Teta/Delta. Por fim, o traçado laranja representa a variação do EMG do RMS ao longo do tempo. As épocas ACORDADO apresentam altos valores de RMS, em contraste com as épocas NREM e REM, que apresentam baixos valores de RMS.

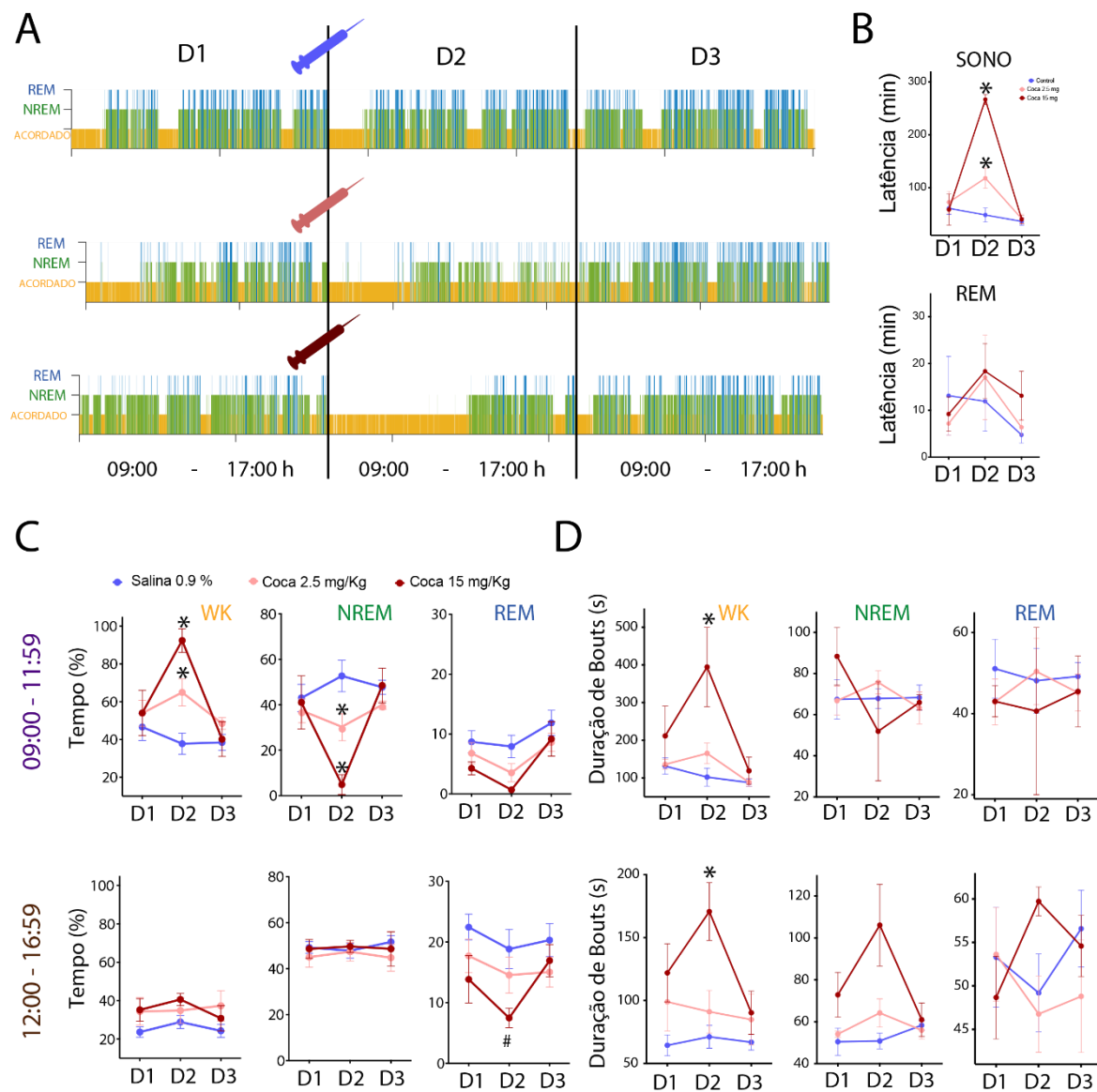


Figura-8 Alterações na arquitetura do sono induzidas por cocaína. B. Exemplos representativos de hipnogramas obtidos de animais pertencentes ao grupo controle (SAL) e aos dois grupos experimentais (COCA-2.5 e COCA-15).

A diferença de nível e de coloração das colunas verticais dos hipnogramas representam os distintos estágios do ciclo sono-vigília: o nível mais baixo (amarelo) representa as épocas ACORDADO, o nível intermediário (verde) representa as épocas NREM e o nível superior (azul) representa as épocas REM. A seringa azul representa a injeção de salina 0.9%, a seringa rosa representa a injeção de cocaína na dose 2.5 mg/Kg e a seringa vinho representa a injeção de cocaína na dose 15 mg/Kg. No primeiro dia (D1), o padrão cíclico de sono e vigília dos animais dos três distintos grupos é semelhante, com sequências de épocas ACORDADO de menor duração e épocas de sono NREM e REM alternadas. No segundo dia (D2), após tratamento, os animais dos três grupos apresentam um período contínuo de épocas WAKE, porém, esse efeito é exacerbado de forma proporcional à dose de cocaína recebida. Note que a injeção de salina, por si só, parece estar associada a indução de um período de vigília de cerca de 60 min. O tratamento com COCA-2.5 aumenta ainda mais esse período subsequente de vigília. Já o tratamento com COCA-15 aumenta o tempo despendido em vigília para cerca de 3 a 4 horas. No terceiro dia (D3) o padrão cíclico de sono e vigília retorna ao padrão normal nos três grupos distintos. **C.** Latência para o sono e para o primeiro episódio de REM: na figura superior, está expresso a latência média (em minutos) para o início do sono nos três dias. Na figura inferior, está expressa a latência média (em minutos) para o início do sono REM nos três dias. **D.** Tempo despendido em cada um dos estágios do ciclo sono-vigília. Os três gráficos superiores representam a porcentagem média do tempo despendido em cada um dos estágios durante o período da manhã. Todos os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média.

Figura – 9

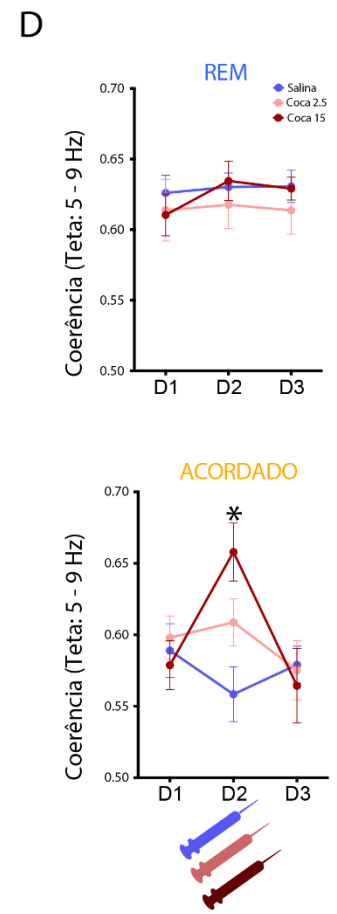
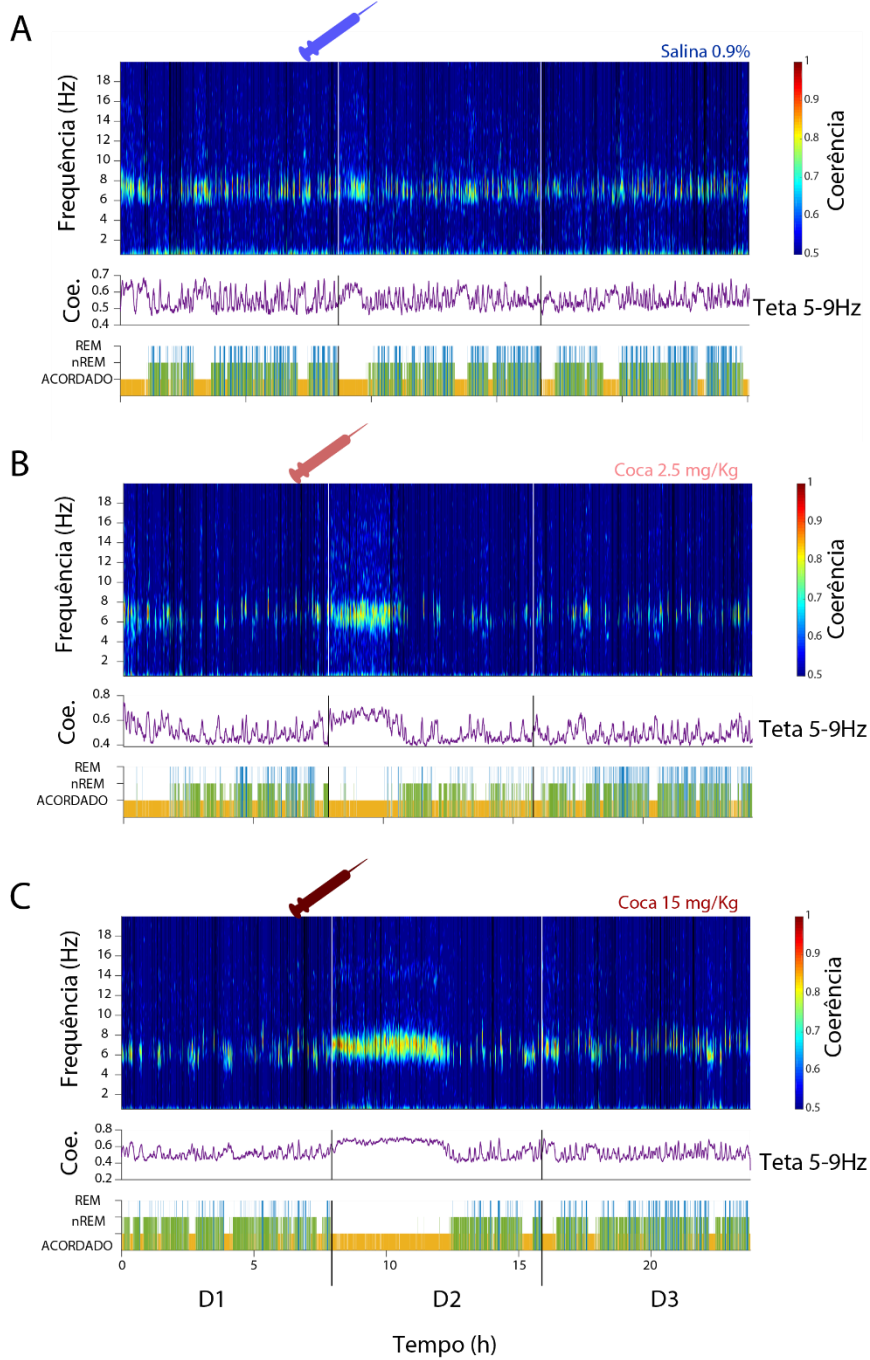


Figura 9. Alteração da coerência de amplitude CA1-mPFC induzida por cocaína. **A.** *Painel superior:* Exemplo da dinâmica de variação de coerência CA1-mPFC ao longo dos três dias de registro de um animal do grupo SAL. O eixo Y indica os componentes distintos de frequência com os limites de 0.7-20 Hz. A escala de cores indica que quanto mais próximo do vermelho, maior a coerência de determinado componente de frequência, em determinada época. As linhas verticais brancas indicam os limites entre os dias e as linhas verticais pretas indicam as épocas que foram excluídas devido à existência de artefatos no sinal. *Painel central:* Coerência média dos componentes de frequência da faixa 5-9 Hz ao longo dos três dias de registro (traçado roxo). As linhas verticais pretas indicam os limites entre os dias. *Painel inferior:* exemplo representativo de hipnograma relativo aos dados apresentados acima. A seringa azul indica o marco temporal da injeção de salina, havendo um breve período de épocas ACORDADO consecutivas, nas quais há um aumento da coerência na faixa 5-9 Hz. Contudo, tal aumento na coerência é equiparável às épocas ACORDADO de outros dias. **B.** Mesma organização do painel anterior, porém provindo de um animal representativo do grupo COCA-2,5, sendo a seringa rosa o marcador temporal da injeção sistêmica de cocaína na dose de 2,5 mg/Kg. Nesse caso, o período de épocas ACORDADO consecutivas é maior em relação ao grupo SAL. Por consequência o aumento da coerência da faixa 5-9 Hz é sustentado por um período maior de tempo. Além disso, há um aumento da coerência (5-9 Hz) das épocas ACORDADO logo após a injeção sistêmica de cocaína na dose de 2.5 mg/Kg se comparadas com épocas ACORDADO de outros dias. **C.** Animal representativo do grupo COCA-15. Seringa vermelha representa o marcador temporal da injeção sistêmica de cocaína na dose de 15 mg/Kg. O período de épocas ACORDADO consecutivas é ainda maior que o período de épocas ACORDADO consecutivas do grupo COCA-2,5. Portanto, o aumento da coerência na faixa 5-9 Hz é sustentado por um período superior ao que foi visto nos outros dois grupos. Por fim, o aumento da coerência (5-9 Hz) das épocas ACORDADO logo após a injeção sistêmica de cocaína na dose de 15 mg/Kg é ainda mais expressivo do que os outros grupos quando comparado ao aumento de coerência épocas ACORDADO de outras dias. **D.** Coerência média das épocas de sono REM e ACORDADO na faixa 5-9 Hz. *Painel superior:* Comparação das coerências médias das épocas de sono REM no período da tarde em cada um dos dias. *Painel inferior:* coerência média das épocas ACORDADO do período de até 3 horas após início do registro (D1 e D3) e após injeção (D2). Todos os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média.

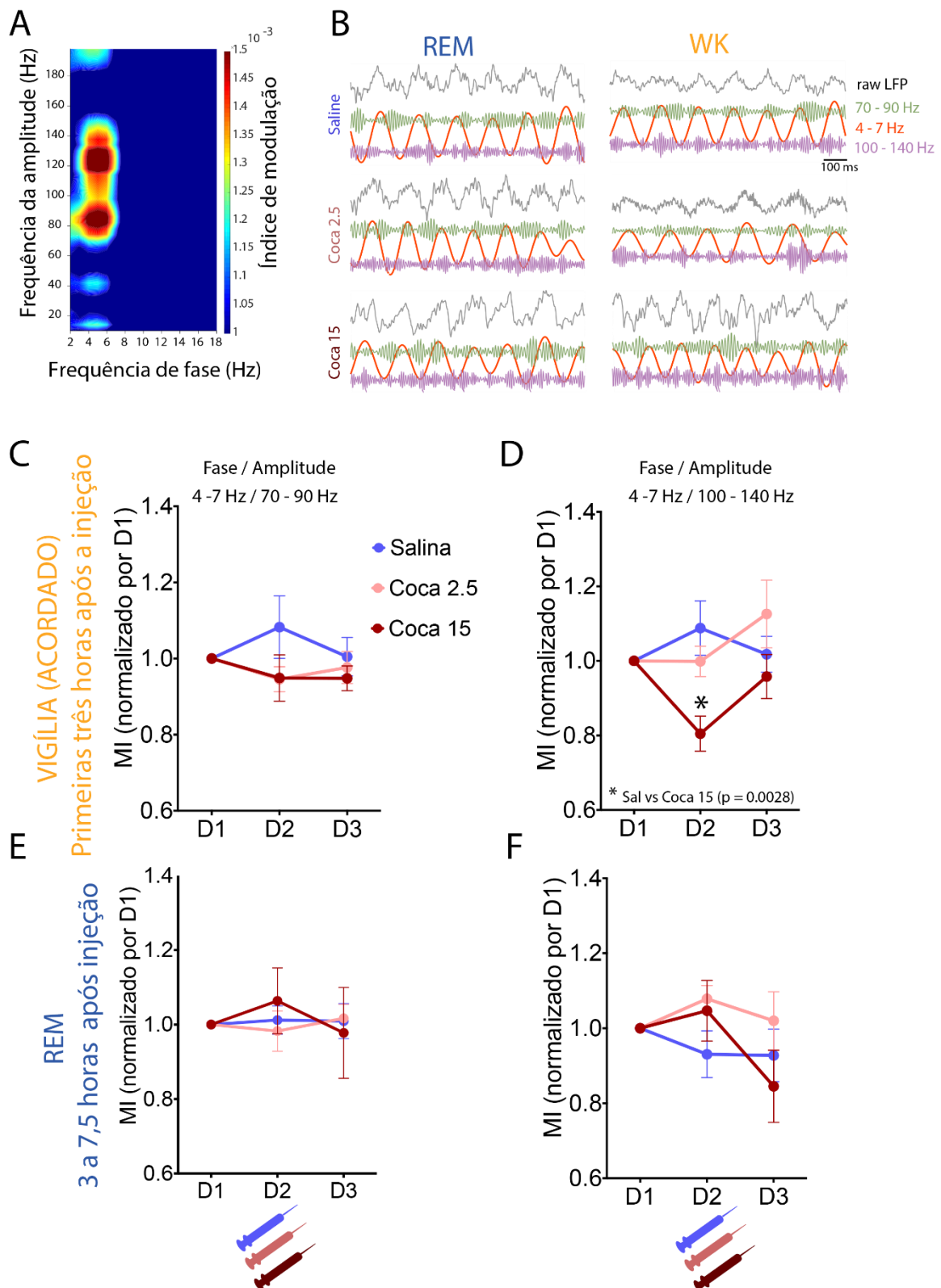
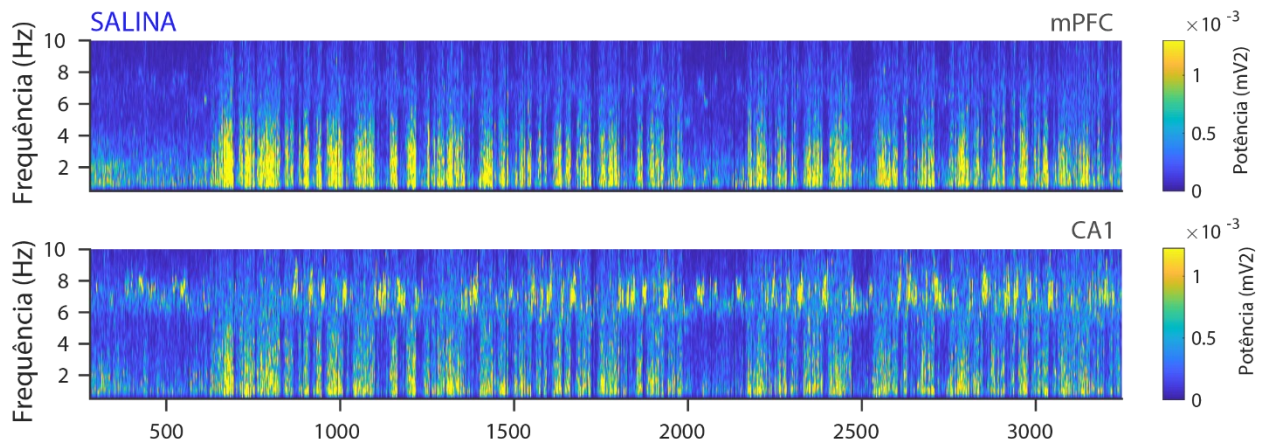


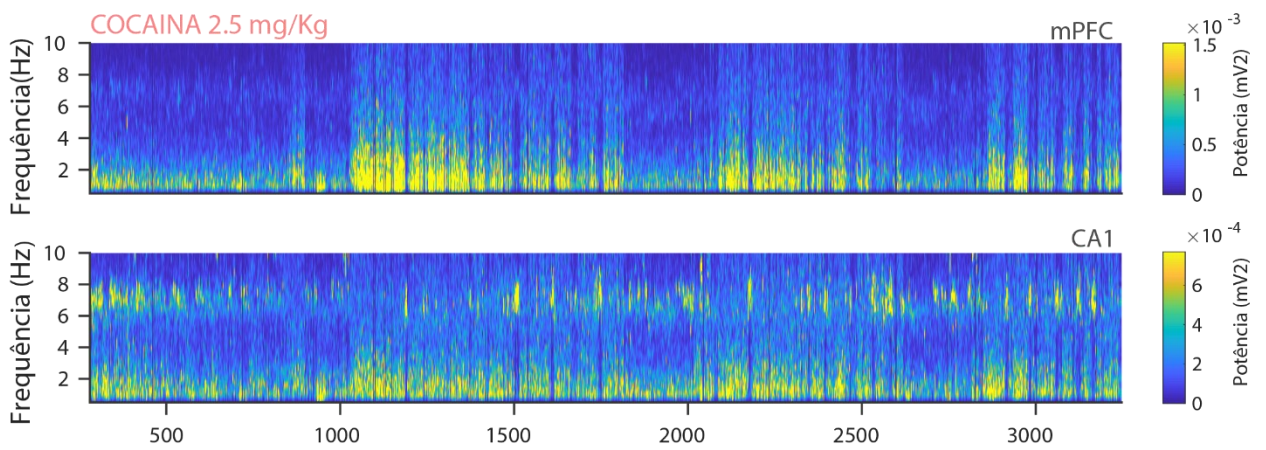
Figura 10. Alterações induzidas por cocaína no acoplamento da fase de Teta (4-7 Hz) e amplitude de Gama (70-90 Hz) e oscilações de alta frequência (100 - 140 Hz) em CA1. A. Comodulograma representativo da média dos

índices de modulação (MI) das épocas REM do grupo SAL no dia D1. O eixo Y indica os componentes de frequência de amplitude, o eixo X indica os componentes de frequência da fase, ambos expressos em hertz (Hz). A escala de cor representa os valores de MI para cada combinação de frequência de fase e de amplitude. Quanto mais próximo do vermelho, maior o valor do MI. Nesse exemplo, é possível visualizar ilhas distintas de modulação: fase (4-6 Hz)/amplitude (10-20 Hz); fase (4-6 Hz)/amplitude (35-45 Hz); fase (4-7 Hz)/amplitude (70-90 Hz); fase (4-7 Hz)/amplitude (100-140 Hz); fase (4-6 Hz)/amplitude (180-200 Hz). Entretanto, os maiores valores de MI estão concentrados nas ilhas fase (4-7 Hz)/amplitude (70-90 Hz) e fase (4-7 Hz)/amplitude (100-140 Hz). Portanto, tais ilhas foram selecionadas para investigações posteriores a respeito da dinâmica do acoplamento de fase/amplitude em CA1 e possíveis alterações produzidas pelas injeções sistêmicas de cocaína nas distintas doses. **B** - Exemplos representativos de traçados do registro de LFP de CA1, evidenciando o padrão de acoplamento da fase das oscilações na faixa 4-7 Hz com a amplitude das oscilações nas faixas 70-90 Hz e 100-140 Hz. O conjunto de traçados superior são exemplos de registros de LFP do grupo SAL, os traçados do centro são exemplos do grupo COCA-2,5 e os traçados inferiores são exemplos do grupo COCA-15. A primeira coluna de traçados apresenta registros de LFP representativos de épocas REM e a segunda coluna apresenta registros de LFP representativos de épocas ACORDADO. Os traçados cinzas são sinais de LFP bruto, os traçados laranjas são sinais filtrados na faixa 4-7 Hz, os traçados verdes são sinais filtrados na faixa 70-90 Hz e os traçados roxos são sinais filtrados na faixa 100-140 Hz. Nos traçados representativos do sono REM, mesmo nos sinais brutos é possível visualizar os ciclos de oscilações Teta (4-7 Hz). Além disso, observa-se que a amplitude das oscilações Gama (70-90 Hz) e oscilações de alta frequência (HFO - 100-140 Hz) variam de forma sincronizada com a fase de Teta. **C**. Índice de modulação (MI) médio da fase de Teta e amplitude de Gama (70-90 Hz) das épocas ACORDADO até 3 horas após início de registro (D1 e D3) ou tratamento (D2). **D**. Índice de modulação (MI) médio da fase de teta e amplitude de HFO (100-140 Hz) das épocas ACORDADO até 3 horas após início de registro (D1 e D3) ou tratamento (D2). **E**. Índice de modulação (MI) médio da fase de teta e amplitude de gama (70-90 Hz) das épocas REM do período da tarde. **F**. Índice de modulação (MI) médio da fase de teta e amplitude de HFO (100-140 Hz) das épocas REM do período da tarde. Todos os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média.

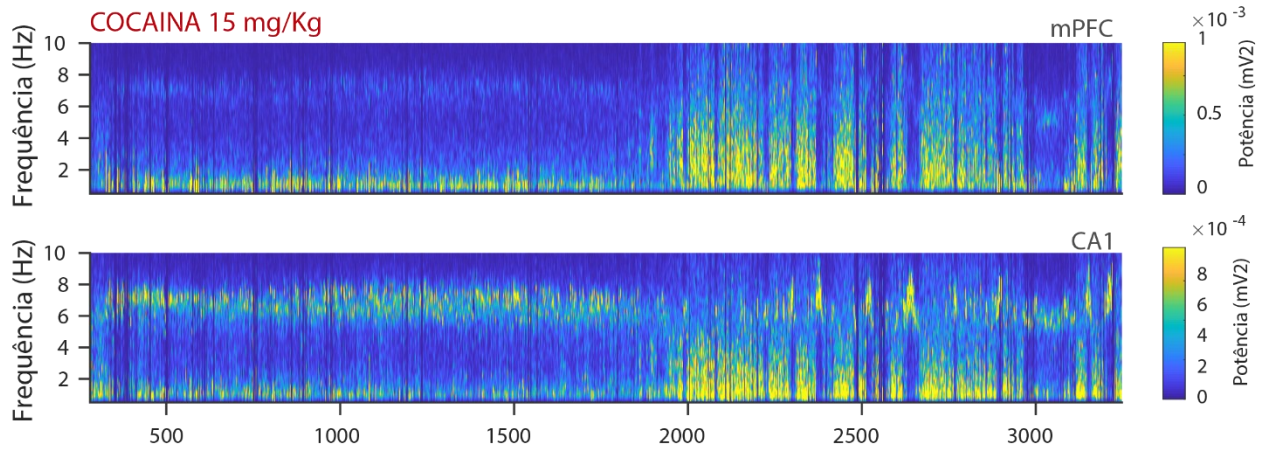
A



B



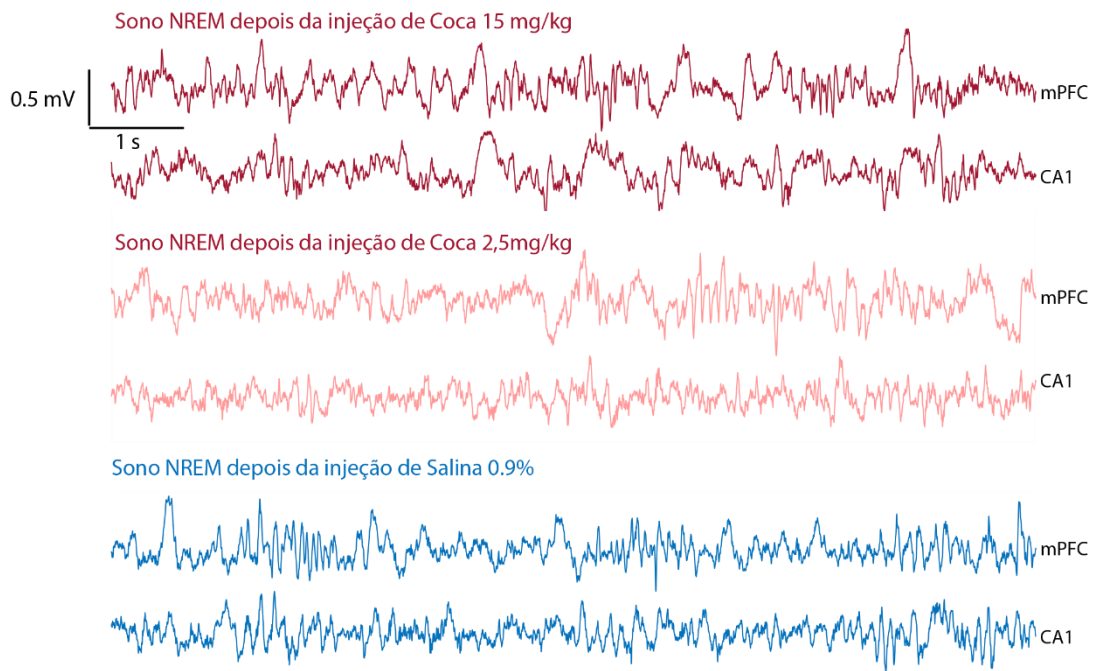
C



Tempo (Blocos de 10 s)

Figura 11. Ajuste homeostático induzido por oscilações Delta (1-4 Hz) no sono subsequente ao tratamento no dia 2 (D2). **A.** Exemplos representativos de espectrogramas dos registros de LFP do mPFC (painel superior) e CA1 (painel inferior) no D2 do grupo SAL. O eixo Y indica os componentes distintos de frequência dos sinais (limitado à faixa 0.7-10 Hz). O eixo X indica os instantes distintos do tempo em que foi realizado o registro (em número de épocas de 10 segundos). A escala de cor indica a intensidade da potência de cada componente de frequência, sendo que quanto mais próximo do amarelo, maior a intensidade da potência. Painel superior: Espectrograma com base no registro do mPFC. Nesta figura é possível visualizar um breve período de baixa potência na faixa 1-4 Hz (delta) logo no início do registro, indicando o breve período que animal se mantém acordado. Posteriormente, há um aumento considerável da potência em Delta, que é substituído consideravelmente em momentos de vigília e sono REM. Interessante notar que existe um aumento inicial da potência na faixa completa de delta (1 - 4 Hz), havendo uma redução desta faixa com o passar do tempo. Por fim, cada um dos períodos com alta potência em delta marca uma época NREM. *Painel inferior:* Espectrograma com base no registro do mPFC. Note que, ao longo do ciclo sono-vigília, padrões oscilatórios com predominância em delta típicos de NREM são intercalados por épocas com alta potência na faixa 6-9 Hz (teta), indicando períodos WAKE ou REM. **B.** Exemplos representativos de espectrogramas dos registros de LFP do mPFC (painel superior) e CA1 (painel inferior) no D2 do grupo COCA-2,5. *Painel superior:* Espectrograma calculado a partir do mPFC. Nesta figura é possível visualizar um período de baixa potência na faixa 1-4 Hz (Delta) de duração nas primeiras 1000 épocas de registro, indicando período que animal se mantém acordado devido aos efeitos da dose de cocaína. Posteriormente, há um aumento expressivo da potência de delta, que se reduz consideravelmente ao longo dos ciclos de sono e vigília. *Painel inferior:* Espectrograma calculado a partir de CA1. **C.** Exemplos representativos de espectrogramas dos registros de LFP do mPFC (painel superior) e CA1 (painel inferior) no D2 do grupo COCA-15. Os mesmos padrões da dinâmica de variação da potência de Delta são observados nesse caso. Porém, o rebote delta pode ser observado mais tardiamente (em torno da época 2000).

A



B

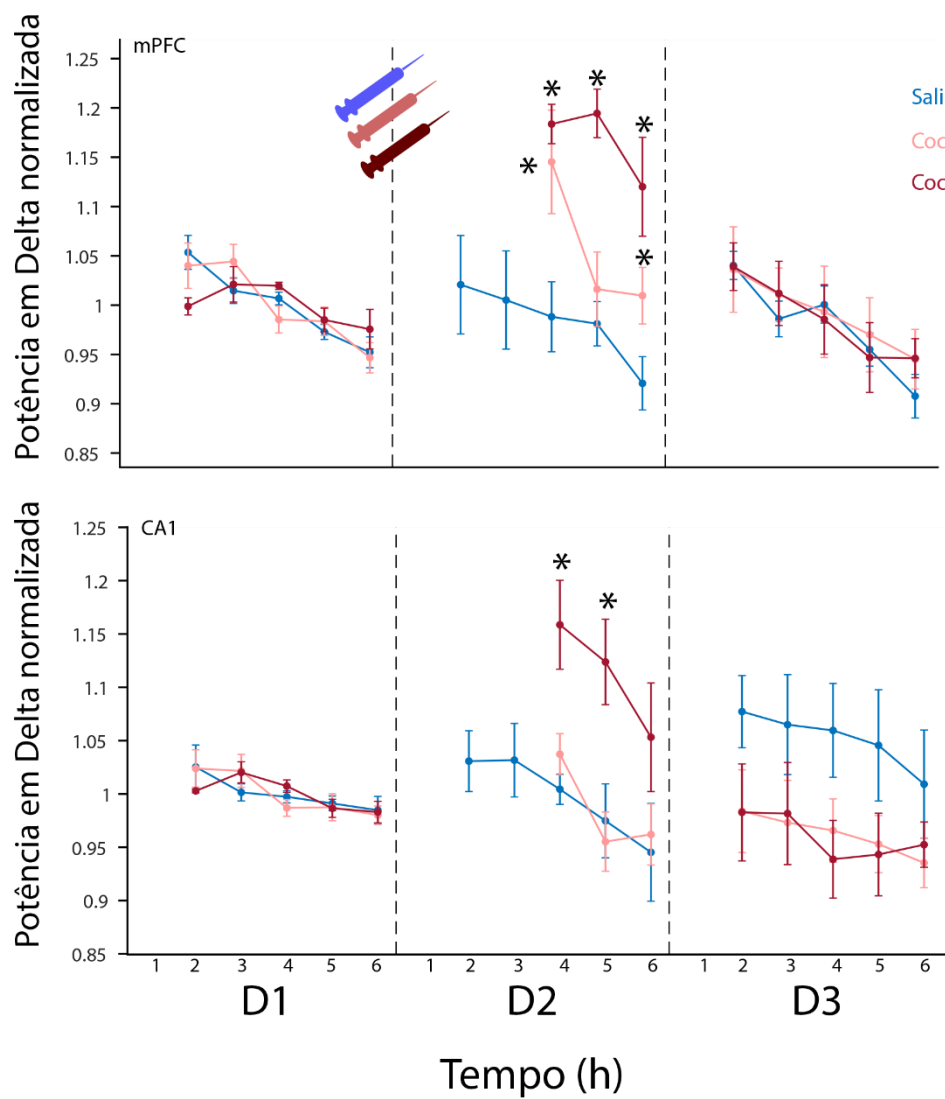


Figura 12. Alterações das potências de banda de frequência induzidas por cocaína no mPFC e CA1 nas épocas de sono NREM. **A.** Exemplos representativos de traçados de registros de LFP do mPFC e CA1 do D2 em nos primeiros períodos de sono NREM após tratamento. Em todos os traçados é possível visualizar oscilações lentas, sincronizadas e de alta amplitude. Os traçados vermelhos representam o grupo COCA-15. Neles é possível observar oscilações lentas com a presença de ondas delta de alta amplitude. Ainda, é possível observar eventos de “*spindle*” associados às ondas delta de alta amplitude no traçado do mPFC. Os traçados rosas representam o grupo COCA-2,5. Nesse caso é possível observar oscilações lentas, porém, com a presença de ondas delta de menor amplitude. Por fim, os traçados azuis representam o grupo SAL. Nesse caso, as oscilações lentas apresentam menor amplitude em relação aos grupos experimentais. **B.** Potência média da banda de delta durante as épocas NREM ao longo dos dias de registro. Cada um dos dias (representados por D1-D3) está separado em 6 períodos (3 períodos de mesma duração durante a manhã e 3 períodos de mesma duração durante a tarde). O primeiro período de cada dia foi suprimido, visto que poucos animais apresentam épocas de sono NREM. Além disso, durante o dia D2, os três primeiros períodos (manhã) foram suprimidos nas médias dos grupos COCA-2,5 e COCA-15, já que poucos animais apresentam épocas de sono NREM. O eixo Y indica a potência média do grupo normalizada pela média das potências dos 6 períodos do primeiro dia. Painel superior: potência média da banda de delta do mPFC. Painel inferior: potência média da banda de Delta de CA1. Todos os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média.

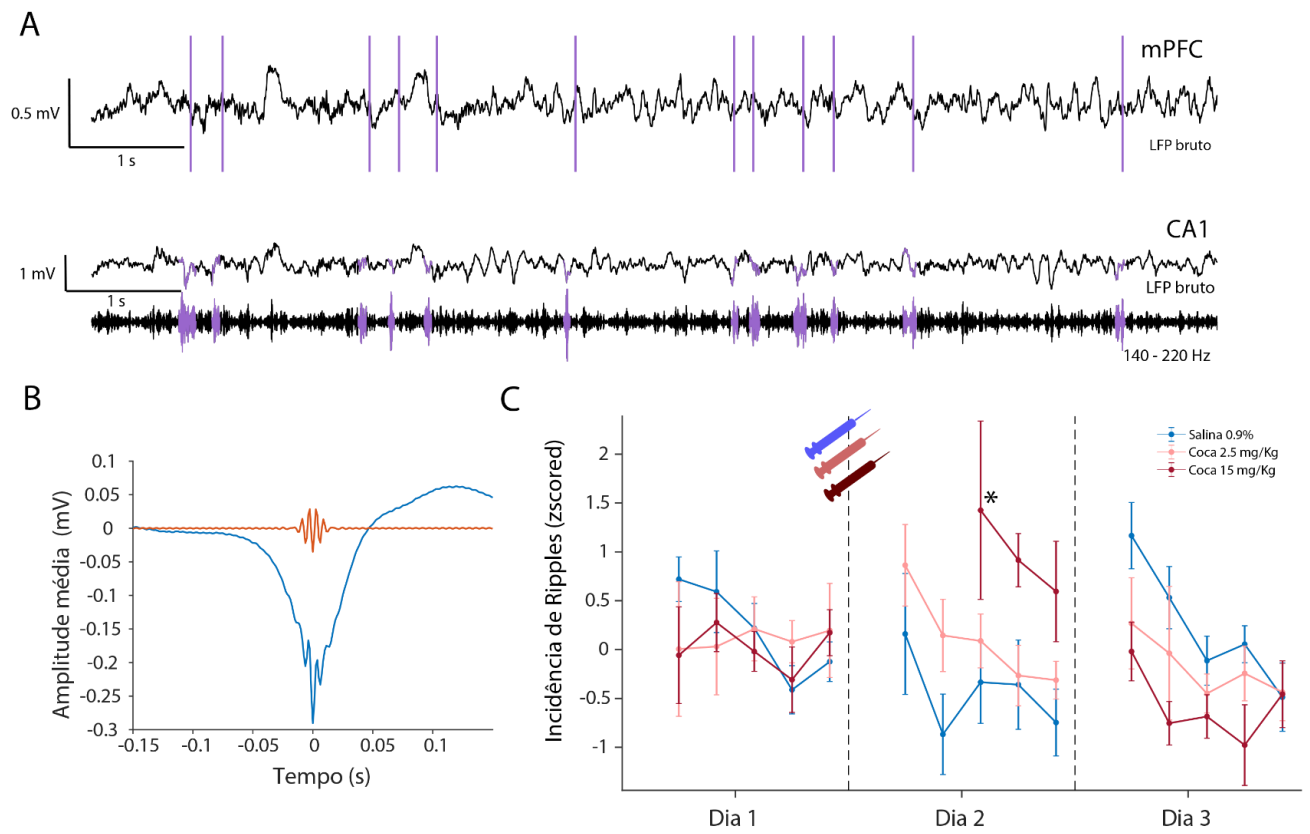


Figura 13. Alterações induzidas por cocaína na incidência de *ripples* hipocampais. A.

Exemplo representativo de traçados de registros de LFP do mPFC e CA1 de uma época NREM com alta incidência de “ripples”. *Painel superior*: registro de LFP do mPFC (sinal bruto, em preto). Para destacar a co-ocorrência entre “ripples” hipocampais e ondas delta corticais, linhas verticais roxas foram adicionadas para indicar os momentos que cada evento de “ripple” foi detectado. O traçado do mPFC apresenta oscilações lentas, sincronizadas e de alta amplitude. *Painel inferior*: registro bruto de LFP de CA1 (acima) e registro de LFP de CA1 filtrado na faixa 140-220 Hz (abaixo). Em ambos os traçados, os eventos de “ripples” são marcados em roxo. O traçado superior apresenta oscilações lentas, sincronizadas e de alta amplitude. Já o traçado inferior apresenta elevações de amplitude transientes, que marcam os eventos de “ripples”. **B.** Traçados das médias dos registros de potencial de campo em torno das “ripples” detectadas (150 ms antes e 150 ms após pico de amplitude do evento detectado). O traçado azul é a média do sinal bruto. É possível visualizar um evento de alta frequência no centro “ripple”, além de uma deflexão de polaridade negativa e alta amplitude “sharp-wave”. O traçado laranja é a média do sinal filtrado na faixa 140-220 Hz. Nesse caso, apenas a oscilação de alta frequência é mantida. **C** - Incidência média de “ripples” ao longo dos dias D1-D3. Cada um dos dias (representados por D1-D3) está separado em 6 períodos (3 períodos de mesma duração durante a manhã e 3 períodos de mesma duração durante a tarde). O primeiro período de cada dia foi suprimido, visto que poucos animais apresentam épocas de sono NREM. Além disso, durante o dia D2, os três primeiros períodos (manhã) foram suprimidos nas médias dos grupos COCA-2,5 e COCA-15, já que poucos animais apresentam épocas de sono NREM. A dose de cocaína 15 mg/Kg produziu um aumento significativo na incidência de “ripples” no período D2-4, em relação ao grupo SAL [SAL(D2-4): -0,3341 “zscore” vs COCA-15(D2-4): 1,426 “zscore”; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(24, 156) = 1,595$, $p = 0,0484$, teste “post hoc” de Tukey, SAL(D2-4) vs COCA-15(D2-4); $p = 0,0068$]. Entretanto, nenhuma das doses de cocaína foi capaz de causar alterações significativas na incidência de “ripples” em nenhum dos 5 períodos do dia D3 ou nos outros períodos do dia D2. Todos os valores de incidência de “ripples” expressos foram normalizados por “zscore”. Todos os dados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média.