

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Igor Menezes Gonçalves Rego

**EFEITOS DA COCAÍNA E DA PRIVAÇÃO DE SONO SOBRE OSCILAÇÕES
HIPOCAMPO-CORTICAIS, SONO E MEMÓRIA**

Belo Horizonte

Julho 2022

Igor Menezes Gonçalves Rego

**EFEITOS DA COCAÍNA E DA PRIVAÇÃO DE SONO SOBRE OSCILAÇÕES
HIPOCAMPO-CORTICAIS, SONO E MEMÓRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Professor Dr. Cleiton Lopes Aguiar

Belo Horizonte

Julho 2022

043

Rego, Igor Menezes Gonçalves.

Efeitos da cocaína e da privação de sono sobre oscilações hipocampo-corticais, sono e memória [manuscrito] / Igor Menezes Gonçalves Rego. – 2022. 72 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Professor Dr. Cleiton Lopes Aguiar.

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

1. Fisiologia. 2. Cocaína. 3. Privação do Sono. 4. Córtex Cerebral. 5. Hipocampo. 6. Eletrofisiologia. 7. Memória. I. Aguiar, Cleiton Lopes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 560 DE IGOR MENEZES GONÇALVES REGO

"Efeitos da Cocaína e da Privação de Sono Sobre Oscilações Hipocampo-corticais, Sono e Memória"

IGOR MENEZES GONÇALVES REGO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **28 de julho de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Rafael Naime Ruggiero, FMRP/USP

Prof. Dr. Rodrigo Neves Romcy Pereira, ICE/UFRN

Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 28 de julho de 2022



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Naime Ruggiero**, **Usuário Externo**, em 01/08/2022, às 13:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Neves Romcy Pereira**, **Usuário Externo**, em 01/08/2022, às 13:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Lopes Aguiar**, **Professor do Magistério Superior**, em 01/08/2022, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1629912** e o código CRC **A3425BDE**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia e às agências de fomento pela oportunidade de expandir meus horizontes, assim como a oportunidade de seguir fazendo ciência junto de pessoas brilhantes que desejam impactar de forma positiva nossa sociedade. Ao Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar agradeço a confiança, pelo acolhimento em seu grupo, as inúmeras horas de trabalho conjunto e por compartilhar seus valores, tanto científicos como sociais. Obrigado pelo apoio e por sua disposição em ouvir, mesmo nos momentos mais difíceis. Ao Prof. Dr. Fabricio Moreira por sua colaboração, atenção, dedicação e por acreditar em nosso trabalho. À Rafaela Polanczyk, Ikaro Beraldo, Bruno Sousa, Mateus Prates, Francisco Carmo, Renan Mendes, Marcela Bastos e Isabela Hubner agradeço a companhia, generosidade, humor, dedicação e amizade, dentro e fora do laboratório. Esse trabalho só foi possível com a ajuda de vocês. Tenho orgulho de ter tido a oportunidade de trabalhar com vocês nos últimos 3 anos e ter partilhado com vocês parte de nossas vidas. Que venham mais anos de amizade e companheirismo. Aos meus pais, Adriana e Cassio, agradeço o apoio infindável presente não apenas nesta fase que se conclui, mas ao longo de toda minha vida. Seus presentes são inúmeros e não existem páginas suficientes no mundo para listar todos.. Aos meus amigos, agradeço a paciência e carinho, os momentos de alegria e luto, fontes inesgotáveis de inspiração, determinação e felicidade; Carolina, Lucas, Laura, Filogônio, Ian, Gabriel, Harrison, Camila, Mariana, Elisa, Henrique, Túlio, Amanda, Pedro, Letícia, Caio, Sophia, Fernanda... vocês são muitos, e sinto-me muito sortudo de me ver cercado por pessoas tão queridas. A todos que participaram de alguma forma nessa jornada, por menor que talvez possa parecer, lhe garanto: Fez toda a diferença.

“Não fixe seu olhar na ponta do dedo em riste, mas
sim na estrela que brilha no horizonte além”.

RESUMO

Drogas estimulantes como anfetamina e cocaína atuam como moduladores do sistema dopaminérgico, sendo capazes de induzir alterações plásticas em circuitos associados à memória e recompensa. Entretanto, ainda não está claro como memórias associativas ao uso dessa substância se estabelecem de forma duradoura e persistente em redes corticais. Uma possibilidade é de que isso ocorra, pelo menos em parte, durante o sono subsequente ao uso da droga. Demonstramos anteriormente que a exposição única à cocaína foi capaz de aumentar a latência para início do sono e, subsequentemente, induzir aumento significativo de potência em delta (0,5 - 4 Hz) tanto no hipocampo, quanto no córtex pré-frontal medial (mPFC), durante o sono de ondas lentas. Neste estudo, testamos se tais efeitos eletrofisiológicos observados se devem a mecanismos específicos induzidos pela cocaína ou se poderiam ser mimetizados por protocolo de privação do sono induzido por locomoção em esteira. 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 receberam injeção sistêmica de salina 0,9%, cocaína 15 mg/kg, ou passaram por privação de sono induzida por esteira por 3 horas e registrados em seguida. No Dia 3, os animais foram registrados novamente para verificar uma possível persistência das alterações observadas no Dia 2. Um segundo grupo de animais passou por teste de reconhecimento de localização de objetos, com dois dias de habituação por 20 minutos na caixa de teste (Dias -1 e 0), seguido de um dia de codificação de memória (Dia 1) por 20 minutos, após a qual os animais receberam injeção de salina 0,9%, cocaína 15 mg/kg ou foram privados de sono por esteira por 3 horas (4 cm/s). Não observamos efeitos significativos induzidos pela cocaína sobre a consolidação de memória em tarefa de localização de objetos, enquanto que o grupo que foi privado de sono por esteira apresentou piora de desempenho. Tanto o grupo Esteira ON quanto o Cocaína 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 theta (5 -12 Hz) para ambos os grupos de tratamento comparados à salina. Após este efeito inicial, observamos um aumento da potência em delta (1-4 Hz) tanto em CA1 quanto no mPFC durante o sono de ondas lentas subsequente ao tratamento em ambos os grupos experimentais quando comparados ao grupo salina. Apesar da diversidade dos efeitos reportados, todos os parâmetros avaliados voltaram ao estado de linha de base 24 h após o tratamento. Em conclusão, nosso estudo demonstrou que existe alta similaridade entre os efeitos

eletrofisiológicos induzidos por cocaína e por privação de sono induzida por esteira, ainda que os seus efeitos sobre a consolidação de memória de localização de objetos sejam distintos. Com base nos nossos achados, hipotetizamos que o aumento da neurotransmissão dopaminérgica seja capaz de ativar mecanismos responsáveis por compensar os prejuízos de memória tipicamente induzidos por privação de sono.

***Palavras chave**— Cocaína, Esteira, Sono, Privação, Oscilações, Córtex, Hipocampo, Eletrofisiologia in vivo, Memória.*

ABSTRACT

Stimulant drugs such as amphetamine and cocaine act as modulators of the dopaminergic system, being able to induce plastic changes in circuits associated with memory and reward. However, it is still unclear how associative memories of substance use are established in a lasting and persistent way in cortical networks. One possibility is that this occurs, at least partially, during sleep following drug use. We previously demonstrated that single cocaine exposure was able to increase sleep onset latency and subsequently induce a significant increase in delta power (0.5 - 4 Hz) in both the hippocampus and medial prefrontal cortex (mPFC) during slow wave sleep. In this study, we tested whether such observed electrophysiological effects are due to specific cocaine-induced mechanisms or whether they could be mimicked by a sleep deprivation protocol in which deprivation is induced by walking on a treadmill. Adult Wistar rats were chronically implanted with electrodes in the mPFC and CA1 region of the hippocampus to record local field potentials. One week later, the animals were habituated to the recording box and, on the following day, to the recording session (Day 1). On Day 2, the animals received a systemic injection of 0.9% saline, cocaine 15 mg/kg, or underwent treadmill-induced sleep deprivation for 3 hours (4 cm/s) and then recorded. On the third day, the animals were registered again. Concurrently, a second group of animals underwent an object recognition test, with two days of habituation for 20 minutes in the test box (Days -1 and 0), followed by one day of memory encoding (Day 1) for 20 minutes. After which the animals received 0.9% saline injection, 15 mg/kg cocaine or were sleep deprived on a treadmill for 3 hours (4 cm/s). We did not observe significant effects induced by Cocaine 15 mg/kg on memory consolidation in the object location task, while the treadmill-induced sleep deprived group showed worse performance. Both the Treadmill ON and Cocaine 15 mg/kg groups showed an increase in sleep onset latency. During the awake state, we observed an increase in coherence between CA1 and mPFC in the theta frequency band (5 -12 Hz) for both treatment groups compared to saline. After this initial effect, we observed an increase in delta power (1-4 Hz) in both CA1 and mPFC during slow wave sleep subsequent to treatment in both treated groups when compared to the saline group. Despite the diversity of reported effects, all parameters evaluated returned to baseline status 24 h after treatment. In conclusion, our study demonstrated that there is high similarity between the electrophysiological effects induced by cocaine and treadmill-induced sleep deprivation, although their effects on object location memory consolidation differ. Based on our findings, we hypothesized that single exposure to cocaine is capable of activating mechanisms

responsible for compensating for memory impairments typically induced by sleep deprivation.

Keywords— *Cocaine, Treadmill, Sleep, Deprivation, Oscillations, Cortex, Hippocampus, In vivo Electrophysiology, Memory.*

Lista de Figuras

1	Esquema simplificado do circuito de recompensa em roedores.	16
2	Alterações das potências de banda de frequência induzidas por cocaína no mPFC e CA1 nas épocas de sono NREM.	22
3	Alterações induzidas por cocaína na incidência de ripples hipocampais.	23
4	Localização de eletrodos de registro de LFP e desenho experimental;	27
5	Desenho esquemático do Teste de Localização de Objetos;	29
6	Padronização e validação do teste de reconhecimento de objetos;	35
7	Efeito de dose aguda de Cocaína 15 mg/kg e locomoção induzida por esteira à 2 cm/s sob o desempenho em tarefa de reconhecimento de objetos;	37
8	Épocas representativas fornecidas pela toolbox para classificação de sono em roedores;	39
9	Densidade espectral de potência dos animais esteira demonstrando a contribuição de cada componente de sinal para cada um dos estágios do sono, tendo o sono nREM uma prevalência de contribuição de Delta (1 - 4 Hz), REM uma prevalência de Theta (5 - 12 Hz).	40
10	Hipnogramas representativos de arquitetura de sono dos animais Esteira ON utilizando o toolbox de classificação;	41
11	Efeitos induzidos por tratamento com salina, cocaína 15 mg/kg e privação de sono induzida por esteira na arquitetura do sono dos animais:	44
12	Coerogramas representativos dos grupos Salina, Cocaína e Esteira ON ao longo dos três dias de registro;	47
13	Alterações de potência, coerência espectral e coerência de fase de theta em animais cocaína 15 mg/kg e Esteira ON comparados a animais salina na fase acordada; (A1, A2 e A3): PSDs de mPFC dos diferentes grupos nos três dias de registro;	48
14	Estados cerebrais representativos de épocas NREM no mPFC e em CA1 nos dias 1 e 2 de registro;	50
15	Classificação representativa evidenciando efeito rebote de delta em animal esteira;	51
16	Alterações de potência, coerência espectral e coerência de fase de delta em animais Cocaína 15 mg/kg e Esteira ON comparados a animais salina em fase NREM; (A1 e A2): PSDs de mPFC dos diferentes grupos nos três dias de registro;	53

17	Estado cerebral representativo de épocas REM no mPFC e em CA1 no segundo dia de registro;	55
18	Alterações de potência, coerência espectral e coerência de fase de theta em animais Cocaína 15 mg/kg e Esteira ON comparados a animais salina em fase REM; (A1 e A2): PSDs de mPFC dos diferentes grupos nos três dias de registro; . . .	56

Lista de abreviaturas

AMPAr Receptor de AMPA

AMPA Ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AP Ântero-posterior

CA1 Cornu Ammonis 1

COCA 15 Cocaína 15 mg/kg

DAT Transportador ativo de dopamina

DI Índice de discriminação (do inglês: discrimination index)

DV Dorso-ventral

GABA Ácido gama- γ amino butírico

GD Giro Denteado

i.p. Intraperitoneal

LFP Potencial Local de Campo (Local Field Potential)

LTD Depressão de Longa Duração (Long-term Depression)

LTP Potenciação de Longa Duração (Long-term Potentiation)

MI Índice de modulação

MLO Tarefa de memória de localização de objetos

ML Meso-lateral

mPFC Córtex Pré-Frontal Medial

NAc Núcleo accumbens

NMDAr Receptor de NMDA

NMDA N-metil-D-aspartate

NREM Sem movimento rápido dos olhos (Non-rapid eye movement)

OMS Organização Mundial da Saúde

REM Movimento rápido dos olhos (Rapid eye movement)

RMS Raiz quadrada média

Saline 0,9% Salina

VTA Área tegmental ventral

WK Épocas de vigília

Conteúdo

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Cocaína e sistema dopaminérgico	15
1.2	Cocaína: efeitos motores e comportamentais	16
1.3	Cocaína: efeitos no sono e memória	18
2	OBJETIVOS	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	Sujeitos experimentais	25
3.2	Fármacos para procedimento cirúrgico	25
3.3	Cirurgia estereotáxica de implante de eletrodos	25
3.4	Lesão eletrolítica, perfusão e fixação do tecido nervoso	28
3.5	Histologia	28
3.6	Teste de localização de objetos	28
4	ANÁLISE DE DADOS	30
4.1	Quantificação e análise de experimentos comportamentais	30
4.2	Pré-processamento	30
4.3	Arquitetura do sono	31
4.4	Latência para o sono	31
4.5	Densidade espectral de potência	31
4.6	Espectrogramas	32
4.7	Coerência espectral	32
4.8	Coerência de fase	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Efeitos da cocaína e protocolo de privação de sono induzido por esteira sobre a memória de localização de objetos	34
5.2	Caracterização eletrofisiológica dos estados comportamentais durante o ciclo sono-vigília	37
5.3	Efeitos da cocaína e da locomoção induzida por esteira sobre a arquitetura do sono	41

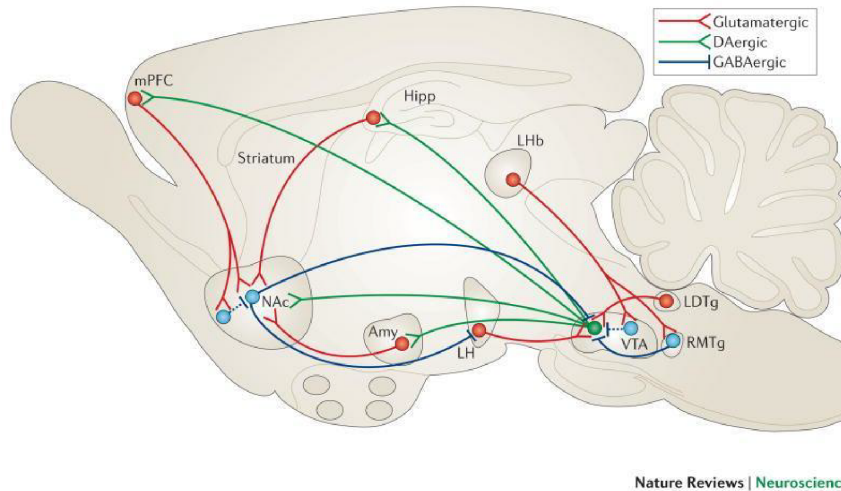
5.4	Efeitos da cocaína e esteira sobre a coerência espectral e coerência de amplitude durante estado acordado	45
5.5	Efeito rebote de ondas delta durante sono NREM induzido por cocaína e por protocolo de privação de sono por esteira	49
5.6	Efeito da Cocaína e protocolo de privação de sono por esteira sobre o sono REM subsequente.	54
6	DISCUSSÃO	57
6.1	Reconhecimento da localização de objetos e sua relação com o acoplamento em theta	58
6.2	Efeito rebote de ondas delta	59
7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	60
8	CONCLUSÃO E PRÓXIMOS PASSOS	60
9	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cocaína e sistema dopaminérgico

O uso de drogas como cocaína, anfetamina, heroína, nicotina e cannabis leva ao aumento da concentração de dopamina no sistema mesocorticolímbico (Figura 1). Esse efeito pode ser observado na área tegmentar ventral (VTA) e em suas projeções para regiões límbicas e corticais como o núcleo accumbens (NAc) e o córtex pré-frontal (PFC) (Bjornes e Green 2018; Prieto et al. 2020; Thomas, Kalivas e Shaham 2008; Everitt, Dickinson e Robbins, 2001; Pins et al., 2020; Bimpisidis e Wallén-Mackenzie, 2019; Rodriguez-Espinosa e Fernandez-Espejo, 2014). Mais especificamente, a cocaína causa o aumento das concentrações de monoaminas (como dopamina, serotonina e norepinefrina) nas fendas sinápticas a partir do bloqueio de sua recaptação, sendo o aumento de dopamina o mais expressivo. Esse bloqueio, em particular, se dá no transportador ativo de dopamina (DAT) que recapta dopamina nos terminais pré-sinápticos, fazendo assim com que a disponibilidade do neurotransmissor aumente para os receptores pós-sinápticos, que podem ser divididos em duas grandes subclasses: os tipo D1 (D1 e D5) e os tipo D2 (D2, D3 e D4) que estão acoplados respectivamente a proteínas estimulatórias Gs ou proteínas inibitórias Gi (Perreault et al. 2013). Além disso, a cocaína também aumenta os níveis de glutamato no VTA, NAc e PFC (Vanderschuren e Kalivas, 2000; Filip, Bubar e Cunningham, 2004; Bimpisidis e Wallén-Mackenzie, 2019). Estudos neurofarmacológicos em modelos murinos indicam que essa atividade neuronal na via mesolímbica parece estar subjacente à recompensa por cocaína e contribui para episódio de relapso em busca da droga (Thomas, Kalivas e Shaham 2008). Schultz et al (1997) demonstrou que agrupamentos de neurônios que disparam na antecipação por alimento e água também são recrutados em antecipação por cocaína, evidenciando a capacidade da droga em recrutar mecanismos neuronais normalmente ativados em resposta a oportunidades de sobrevivência, e também sua capacidade de ativar esta circuitaria de forma mais intensa do que outros reforços como socialização e oportunidade reprodutiva. A superestimulação desses circuitos pode acarretar em mudanças comportamentais duradouras, eventualmente culminando em dependência (Miles et al., 2017).

Figura 1: Esquema simplificado do circuito de recompensa em roedores. A natureza das aferências e eferências de VTA 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.



Fonte: RUSSO & NESTLER, 2013.

1.2 Cocaína: efeitos motores e comportamentais

Como outros estimulantes, a cocaína altera o comportamento animal de acordo com dosagem e rota de administração, de modo que baixas doses podem afetar o comportamento locomotor, enquanto que altas doses podem levar à convulsões e até morte (Woolverton e Johnson, 1992; National Institute on Drug Abuse, 2016). Além disso, os efeitos comportamentais são muito subjetivos, variando enormemente de um indivíduo para o outro (Kalivas et. al., 1998). A manifestação e desenvolvimento desses efeitos parece variar de maneira dose dependente tanto em humanos como em modelos animais. (Woolverton, Johnson, 1992). Por exemplo, enquanto as evidências mostram que pequenas quantidades de cocaína podem melhorar a aquisição de memória em roedores, humanos que fazem uso mais extenso da droga relatam perturbações na memória (Woolverton, Johnson, 1992). Em humanos, pequenas quantidades de cocaína podem fazer os pacientes se sentirem eufóricos, enérgicos, mentalmente alertas, visão, audição e tato hipersensitivos e aumento de loquacidade. Além disso, a droga pode reduzir a necessidade subjetiva de comer e dormir e melhorar o desempenho em tarefas físicas e intelectuais (National Institute on Drug Abuse, 2016). No caso de dosagens mais altas, o paciente pode apresentar comportamentos mais agressivos, com irritabilidade, agitação, ansiedade, pânico e paranóia, assim como tremores, vertigem, espasmos musculares e alterações nas percepção de dor (Licata et. al.,

1992, National Institute on Drug Abuse, 2016). Já os efeitos fisiológicos incluem constrição de vasos sanguíneos, dilatação pupilar (midríase), aumento da temperatura corporal, da frequência cardíaca e da pressão sanguínea (National Institute on Drug Abuse, 2016), Sabe-se, no entanto, que padrões de comportamento promovidos e mantidos pela cocaína são determinados não só pela dosagem, mas principalmente pela rotina de reforço, bem como pelo contexto em que o animal está inserido (Woolverton, Johnson, 1992). Uma particularidade relevante do uso dessa droga é sua habilidade de reforçar o comportamento de auto-administração, que é encontrado em várias espécies, incluindo humanos (Woolverton, Johnson, 1992), com o uso repetitivo de cocaína levando a alterações de longa duração na estrutura cerebral (Kalivas et al., 1998). Assim, o comportamento de busca pela droga pode se tornar cada vez mais controlado por processos motivacionais dos quais o paciente em grande parte não está ciente (Moeller et. al, 2010) e as chances de relapso ao ser exposto à droga após um período de abstinência é maior (De Vries et al., 1998). Além disso, em períodos de abstinência de droga, é relatado a hipersonolência, a disforia, anergia, depressão generalizada e a perda de peso (Woolverton e Johnson, 1992, Angarita, 2016), que também age como reforço para a busca da droga, levando ao recomeço do uso. Estudos com animais mostram que os comportamentos evocados pela cocaína e outras drogas estão associadas, principalmente, ao aumento de dopamina no sistema dopaminérgico mesolímbico, modulando assim os efeitos psicomotores e de recompensa evocados pela substância (Berro et. al, 2014). Esses comportamentos incluem hiperatividade, relacionado principalmente à dopamina no NAc na exposição aguda, e no caso de exposição intermitente à droga, a sensibilização locomotora associada a transmissão aminoacídica no NAc (Filip et. al., 2006). A sensibilização se caracteriza por exposição repetitiva à psicoestimulantes, ocorrendo um aumento progressivo e expressivo dos efeitos hiper locomotores. Essa sensibilização motora persiste mesmo após o fim do tratamento crônico por psicoestimulantes (Pierce and Kalivas, 1997). Há possibilidade de que essa sensibilização tenha papel no surgimento de ataques de pânico, paranóia e letalidade relacionados ao consumo de cocaína (Woolverton, Johnson, 1992). Quanto ao comportamento de busca por droga após tratamento crônico, sabe-se que ele pode ser provocado mesmo após períodos prolongados sem exposição à droga após o administração de uma única dose (De Vries et. al., 1998), e o restabelecimento de adição induzido pela droga resulta do processo de sensibilização, que tem um papel crucial na busca pela droga (De Vries et. al., 1998). É possível portanto que, assim como a hiperlocomoção em ratos pode estar relacionada com a hiperexcitabilidade, em humanos, o processo de sensibilização pode explicar o processo de recaída de uso

nos pacientes (Filip et. al, 2006).

1.3 Cocaína: efeitos no sono e memória

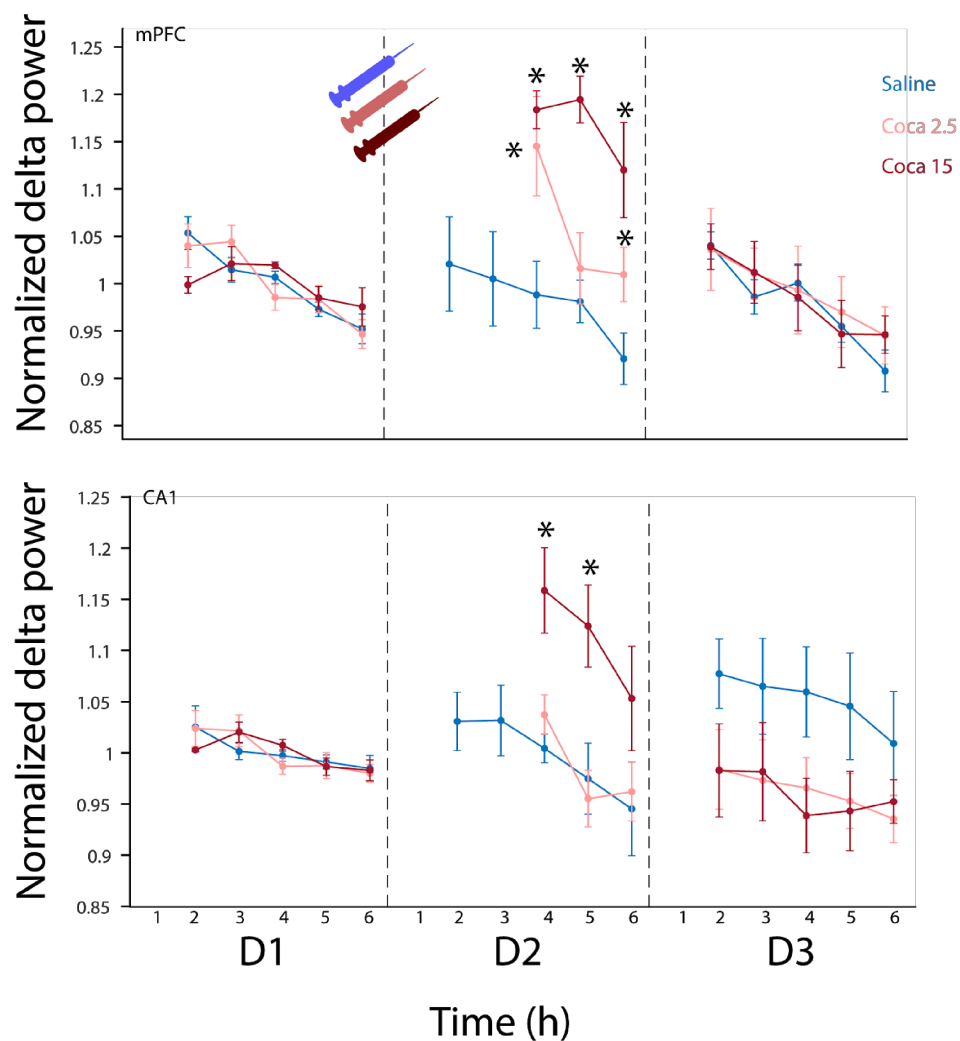
O sono é um estado que é manifestado em todos os níveis de organização biológica, desde mecanismos genéticos e intracelulares, até ao nível de sistemas neurais e órgãos, controlando funções fisiológicas, comportamentais e cognitivas (Pace-Schott e Hobson, 2002). Pode-se dividir o sono em três estados principais: o estado acordado, onde o indivíduo se encontra ativo, o sono NREM (non rapid eye movement em inglês), caracterizado por uma grande sincronização de disparos neurais e oscilações de baixa frequência onde prevalecem ondas de baixa frequência e alta amplitude; e o sono REM (rapid eye movement em inglês), caracterizado por movimentação rápida dos olhos e inibição dos músculos e por oscilações de alta frequência e baixa amplitude, com oscilações em frequência gamma (30 – 80 Hz) altamente sincronizadas e prevalência de ondas theta (5 – 12 Hz (Buzsáki, 2006). Sabe-se que o sono é essencial para aprendizado e memória, sendo um período de particular importância no qual ocorre a consolidação de memórias de curta-duração para longa-duração, com a privação de sono gerando prejuízos no aprendizado, atenção e várias outras funções cognitivas (Chen e Wilson, 2017). Uma das principais teorias sobre como ocorre a consolidação de memórias sustenta que exista uma interação espaço-temporal precisa da atividade neural entre hipocampo e neocórtex durante o sono, principalmente o sono de ondas lentas, que pode se apresentar dividido em diferentes fases conforme a espécie (Graves, Pack e Abel, 2001, Pace-Schott e Hobson, 2002). No entanto, outros estudos indicam uma possível função do sono REM em processos de consolidação de memória (Boyce et. al, 2016). Foi previamente sugerido que a sincronização e dessincronização dos padrões oscilatórios cerebrais durante o sono NREM e REM são consequência de interações entre sistemas de neurotransmissores, como por exemplo o colinérgico e serotoninérgico (Pace-Schott e Hobson, 2002, Lorincz e Adamantidis, 2017). A dopamina, apesar de menos estudada, parece ter um papel importante na alteração das fases do sono, provavelmente interagindo com outros neurotransmissores. Em roedores, a deleção do gene do (DAT) induz a redução do sono NREM e estado de vigília prolongado. Além disso, administração sistêmica de um agonista D1 ou D2, que provoca o aumento da captação de dopamina nos terminais pós sinápticos, influencia ambos REM e NREM (Dauvilliers et al., 2015). Em humanos, inibidores da recaptção de dopamina (como psicoestimulantes de ação semelhante a cocaína) e agonistas do receptor de dopamina são usados como tratamento de narcolepsia e sonolência, potencializando a vigília e prevenindo

o sono (Pace-Schott e Hobson, 2002). Prejuízos no sono são frequentemente observados em pacientes que fazem uso de substâncias psicoativas, como a cocaína, e estão presentes tanto no uso agudo ou crônico, quanto no período de abstinência da droga (Knapp et. al., 2007; Bjorness et. al., 2018; Cortes et. al., 2016). Essa associação entre sono e uso de substâncias parece ser, no entanto, bidirecional, com problemas no sono aumentando os riscos do desenvolvimento de transtornos por uso de substâncias levando a problemas com sono, sendo essas perturbações no ciclo sono e vigília observadas ambos em modelos humanos quando modelos animais (Angarita, 2016; Bjorness et. al., 2018). A conexão entre sono e uso de drogas pode ser explicada pela fisiologia do sono e potencialmente pela sobreposição de sistemas de neurotransmissores e regiões cerebrais onde dada substância atua e onde o processo do sono ocorre (Angarita et. al., 2014). Alguns experimentos envolvendo polissonografia em usuários frequentes de cocaína mostram uma maior latência para o começo do sono, além de uma redução na eficiência do sono (Pace-Schott et. al., 2005). Esses pacientes possuem tempo de NREM drasticamente reduzido em relação a pacientes controle (Angarita, 2016 Knapp et. al., 2007). Após o uso agudo, ocorre uma latência para o início do sono e redução de sua eficiência (Cortes et. al., 2016, Angarita, 2016). Além disso, é observada uma supressão inicial dos períodos de sono REM, seguida por um aumento substancial na duração dos períodos subsequentes de REM e redução de sua latência (efeito "rebote), com aumento do tempo de REM e redução de sua latência (Angarita 2016). Já durante os primeiros dias de abstinência ocorre um efeito rebote, caracterizado pela hipersonia (aumento de eficiência do sono noturno e maior propensão ao sono ao longo do dia) (Angarita, 2016, Bjorness et. al., 2018), mas também ocorre uma maior fragmentação do sono (Pace-Schott et. al., 2005), com indivíduos em abstinência tendo maior propensão ao sono durante o dia (Bjorness et. al., 2018). Estudos mostram que nesse período ocorre uma redução do tempo total de sono REM e do SWS (Angarita et. al, 2013; Angarita et. al., 2016), além de uma latência menor do sono em geral. Também é observada uma maior duração do sono, bem como uma maior duração do sono REM , enquanto que em abstinência tardia os pacientes desenvolvem um padrão de insônia crônica com grande latência de sono e baixa eficiência de sono (Angarita et. al., 2016; Pace-Schott et. al., 2005, Cortes et. al., 2016, Bjorness et. al., 2018). Ocorre também uma redução do sono REM, que pode inclusive estar associada ao relapso de uso (Cortes et. al., 2016), e um aumento do tempo de SWS (Angarita, 2016, Bjorness et. al., 2018). Entretanto, os estudos envolvendo a perturbação no sono de pacientes que fazem uso de cocaína apresentam resultados muitas vezes conflitantes, sendo relatado insônia ou hipersonia

em períodos de abstinência (Yang et. al., 2011), com alguns estudos indicando um aumento percentual de sono REM, em vez de uma redução (Knapp et. al., 2007). No entanto, apesar da piora considerável do sono que os estudos mostram, em pesquisas qualitativas os entrevistados reportaram melhora do sono, o que afeta o término do tratamento, tendo em vista que o paciente não reconhece a anormalidade dos sintomas (Angarita et. al., 2014). Ademais, foi demonstrado que tratamentos com anfetamina podem aumentar a ocorrência de ripples (140-250 Hz) e sua amplitude durante episódios subsequentes de sono de ondas lentas (Ponomarenko et al., 2003). Esse “ripple rebound” foi interpretado por autores como uma assinatura eletrofisiológica da reativação de conjuntos neuronais hipocampais durante sono NREM. Uma vez que a anfetamina promove um aumento de atividade de circuitos dopaminérgicos, é possível que a cocaína poderia afetar não só a arquitetura do sono em si, mas também certos processos de plasticidade sináptica e memória que gradualmente decorrem durante fases específicas do sono. Particularmente, é possível que a coordenação entre áreas neocorticais e hipocampais durante sono REM e NREM possam ser perturbadas após tratamento com cocaína, levando a uma persistente anormalidade comportamental e/ou déficit cognitivo. Em trabalho recente do nosso grupo de pesquisa (Gusmão, 2020), demonstramos que a cocaína é capaz de afetar padrões oscilatórios e a coordenação entre CA1 e PFC, assim como produzir uma maior amplitude das ondas lentas durante o sono não-REM e um aumento da incidência de ripples hipocampais (Figuras 2 e 3), que são oscilações de alta frequência relevantes para memória. O trabalho propôs analisar alterações na formação de memória após dose aguda de diferentes doses de cocaína (2,5 mg/kg e 15 mg/kg), onde não foram observadas alterações na formação de memórias relacionadas à localização de objetos. No que diz respeito à alterações na rede neural, nossos resultados foram um pouco diferentes do esperado, tendo como base as evidências existentes em estudos com anfetamina. Sabe-se que em animais tratados com anfetamina ocorre um aumento da potência de gamma logo após a administração da droga; no entanto, o mesmo não foi observado na administração de cocaína. As doses de 15 mg/kg, e de 2,5 mg/kg de cocaína foram capazes de induzir alterações na potência média de gamma no mPFC ou em CA1, do hipocampo, durante sono REM e durante vigília. É possível, no entanto, que uma dose única, com administração sistêmica de cocaína, não seja o suficiente para sustentar alterações em gamma, assim como o baixo número de sujeitos experimentais pode ter mascarado alguma diferença. Zhu et. al. 2019 demonstraram que o aumento do acoplamento (sincronia) entre theta e gamma poderia estar subjacente ao desenvolvimento de dependência de heroína. Em nosso estudo, no entanto, observamos uma

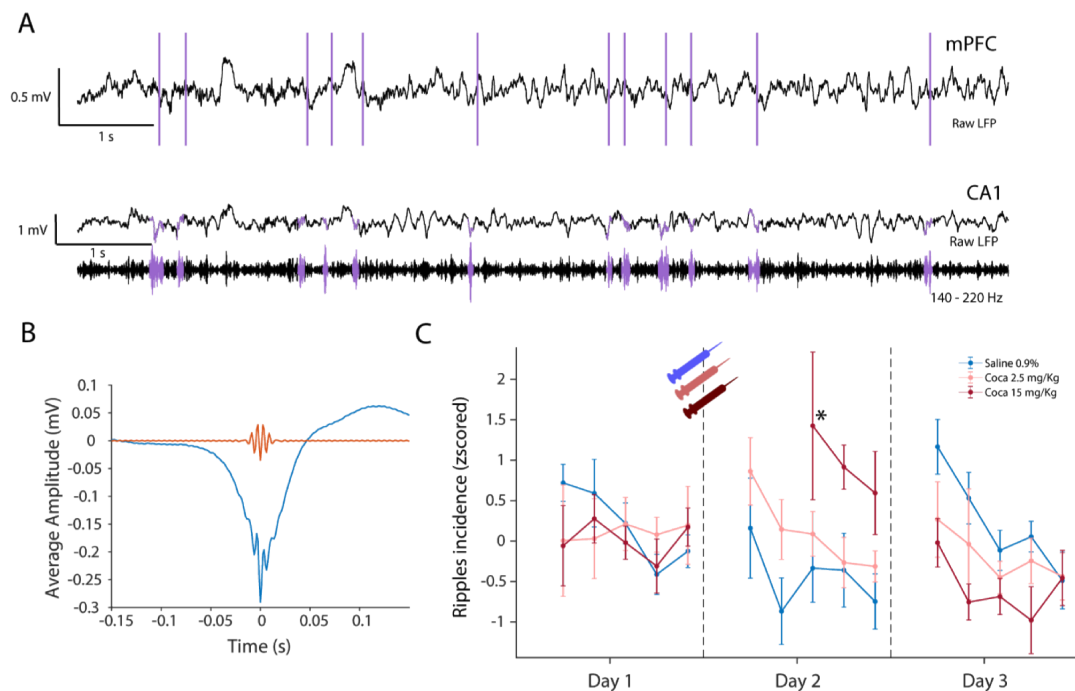
redução do acoplamento entre fase de theta e amplitude de gamma durante o estado acordado em animais que receberam a dose aguda de 15mg/kg. No entanto, não há descrições na literatura sobre acoplamento theta-gamma após administração de cocaína. Quanto à potência de delta, observamos durante o sono subsequente à administração aguda de cocaína um aumento de sua potência no mPFC, associado ao aumento de ripples hipocampais. Sjulson et. al. 2018 observou também um aumento de ripples hipocampais em animais durante o sono após tarefa de preferência condicionada à local (CPP), hipotetizando que esse rebote de ripples poderia ser uma janela temporal para a consolidação de memória associativa da droga com o contexto em que foi administrada. Entretanto, ainda não é claro o quanto os efeitos oscilatórios observados por nosso estudo se devem ao estado hiper dopaminérgico induzido pela cocaína ou à privação do sono resultante da hiperlocomoção induzida pela droga.

Figura 2: 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 inglês: local field potential) do mPFC e CA1 do D2 em nos primeiros períodos de sono NREM após tratamento. Em todos os traçados é possível visualizar oscilações lentas 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.



Fonte: Adaptado de Gusmão et al., 2020.

Figura 3: 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. Pannel 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 e de alta amplitude. Pannel 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 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.



Fonte: Adaptado de Gusmão et al., 2020.

2 OBJETIVOS

Testar se os efeitos observados nos padrões oscilatórios durante o sono subsequente a aplicação de cocaína se deve à hiperdopaminergia induzida pela droga ou simplesmente pela privação de sono decorrente de hiperlocomoção.

Comparar os efeitos da locomoção induzida por esteira com a hiperlocomoção induzida por hiperdopaminergia sobre:

1. O tempo de vigília e arquitetura do sono;
2. A coerência de amplitude em theta entre CA1 e mPFC;
3. Padrões oscilatórios durante o sono, tais como oscilações delta, theta e gamma;
4. Coerência de fase e coerência espectral de theta na região CA1 do hipocampo durante estado acordado e de sono REM;
5. A consolidação de memória de localização de objetos

3 METODOLOGIA

3.1 Sujeitos experimentais

Foram utilizados 31 ratos da linhagem Wistar adultos machos entre 250 e 300 g, provenientes do Centro de Bioterismo do ICB-UFMG (CEBIO). 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 tiveram livre acesso a ração balanceada padrão e água. Durante todo o período em que os experimentos ocorreram, os mesmos 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)

3.2 Fármacos para procedimento cirúrgico

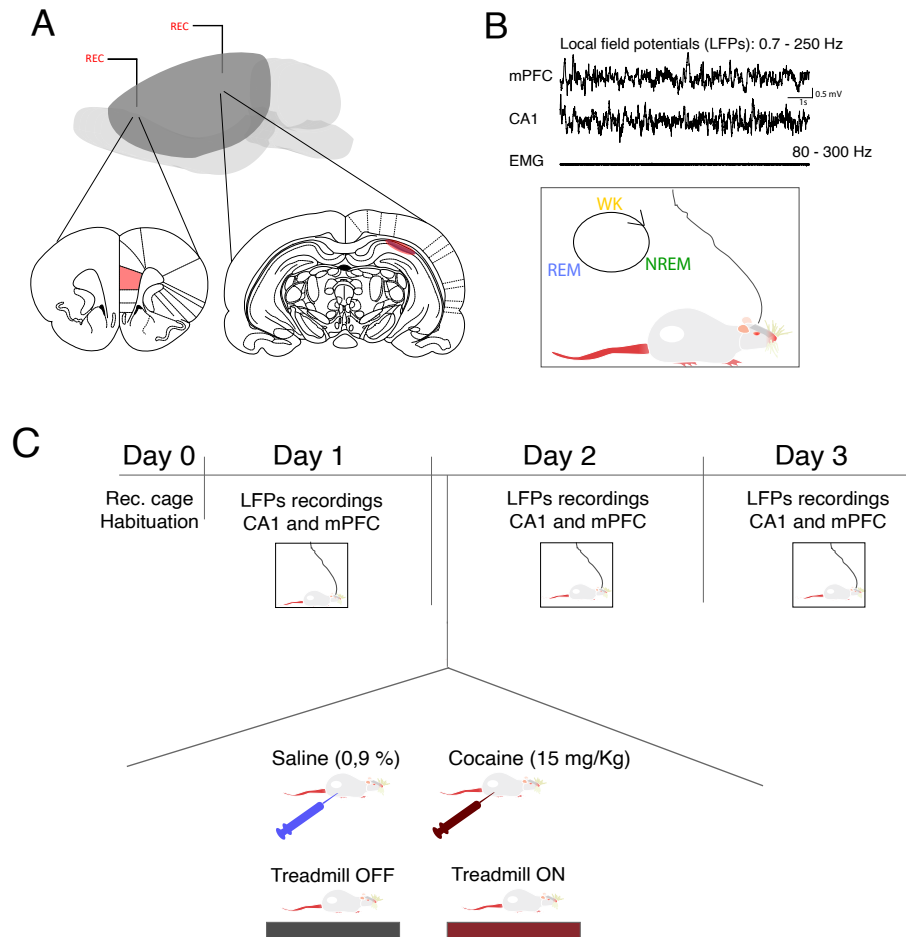
Foram utilizados para anestesia geral durante a cirurgia de implantação de eletrodos cetamina (cloridrato cetamina a 10%, diluída veículo estéril) e xilazina (cloridrato xilazina a 2%, diluída veículo), aplicadas por via intraperitoneal e intramuscular. Adicionalmente, lidocaína (2% em solução de NaCl 0,15M) foi utilizada para anestesia local no escalpo onde a incisão inicial ocorreu.

3.3 Cirurgia estereotáxica de implante de eletrodos

Inicialmente, calcula-se a dose de anestésico a ser recebida por animal de acordo com o seu peso (1 ml/Kg), seguido por aplicação de 0,7 ml/Kg de cetamina e 0,35 ml/Kg de xilazina por via intraperitoneal, por sua vez seguida de complemento de 0,5 ml/kg de cetamina e 0,25 ml/kg de xilazina por via intramuscular após início da sedação. A sedação e anestesia dos animais foi verificada através do pinçamento da cauda do animal, para observar a ausência de resposta. Em seguida, foi realizada a tricotomia do escalpo com o auxílio de aparelho de barbear e a fixação do animal em aparato estereotáxico (KOPF; KOPF instruments; EUA). Após a fixação, foi realizada assepsia do escalpo com solução de iodo e água oxigenada, seguida de injeção subcutânea de lidocaína (2% em solução de NaCl 0,15M) na região de incisão. Durante todo o procedimento, os animais tiveram sua temperatura corporal controlada por meio de um sistema de aquecimento desenvolvido pela equipe, que utiliza a circulação de água quente para man-

ter a temperatura dos animais em torno de 37°C. Após a limpeza da região do crânio exposta pela incisão, o bregma foi utilizado como região de referência para a realização das craniotomias, estando situado na região ântero-posterior e médio-lateral. As mesmas foram realizadas no hemisfério esquerdo segundo as coordenadas: ântero-posterior (AP): -5,4mm; médio-lateral (ML) -4,6; dorso-ventral (DV) -2,5 mm para CA1 e ântero-posterior (AP) + 3,0 mm; médio-lateral (ML) 0,5 mm; dorso-ventral (DV) -3,5 mm para o mPFC (PAXINOS; WATSON, 1998) (PAXINOS; WATSON, 2017) Em seguida, foram realizadas duas craniotomias na região occipital do crânio para a inserção de dois parafusos de aterramento e referência, aos quais foram soldados fios de prata presos ao conector do implante final, além de 3 craniotomias adicionais para inserção de parafusos estruturais para aumentar a estabilidade da fixação do acrílico na formação do capacete final. Foram implantados três eletrodos monopolares de fios de tungstênio encapados com teflon (60 um de diâmetro; A-M Systems, Inc., EUA) nas regiões alvo CA1 e mPFC, inseridos em registro ativo, permitindo a visualização em tempo real dos LFPs a medida que se aproximavam de suas respectivas regiões alvo, para a avaliação do perfil das oscilações, sendo em particular esperado uma prevalência de theta (5-12 Hz) na região hipocampal. Adicionalmente, um eletrodo foi implantado na musculatura do pescoço para registro de atividade motora (eletromiografia, EMG) dos animais durante atividade comportamental e para auxílio de classificação de estágios de sono (Figura 4A e B).

Figura 4: (A): Localização de eletrodos de registro de LFP e desenho experimental; Corte coronal do encéfalo de rato demonstrando as regiões-alvo; (B): Exemplos de registro de LFP no mPFC, CA1 e EMG, suas faixas respectivas faixas de frequência e esquematização de registro eletrofisiológico, com ciclagem entre as diferentes fases de sono e estado acordado; (C): Esquematização do desenho experimental com grupos experimentais Salina 0,9% e Cocaína 15 mg/Kg (coletados por Gusmão et al, 2020) e grupos esteira do vigente estudo comparado ao atual estudo.



Adaptada de Gusmão et al. 2020

3.4 Lesão eletrolítica, perfusão e fixação do tecido nervoso

Após o último dia de registro, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina, e passaram por protocolo de estimulação, gerando lesões eletrolíticas para a verificação da posição dos eletrodos nas regiões inseridas. Em seguida os animais receberam overdose de cetamina e logo após a cessação de funções vitais foram perfundidos com uma solução tampão fosfato-salina (PBS – 250 ml e paraformaldeído 4% (PFA – 200 ml) para fixação de tecido. Os encéfalos foram extraídos após a perfusão e imersos em uma solução de PFA a 4% overnight e em seguida crioprotetidos em soluções alternadas de sacarose 10, 20 e 30% a cada dia por três dias. Em seguida, foram congelados por submersão em isopentano (40s) e armazenados em freezer -80 °C.

3.5 Histologia

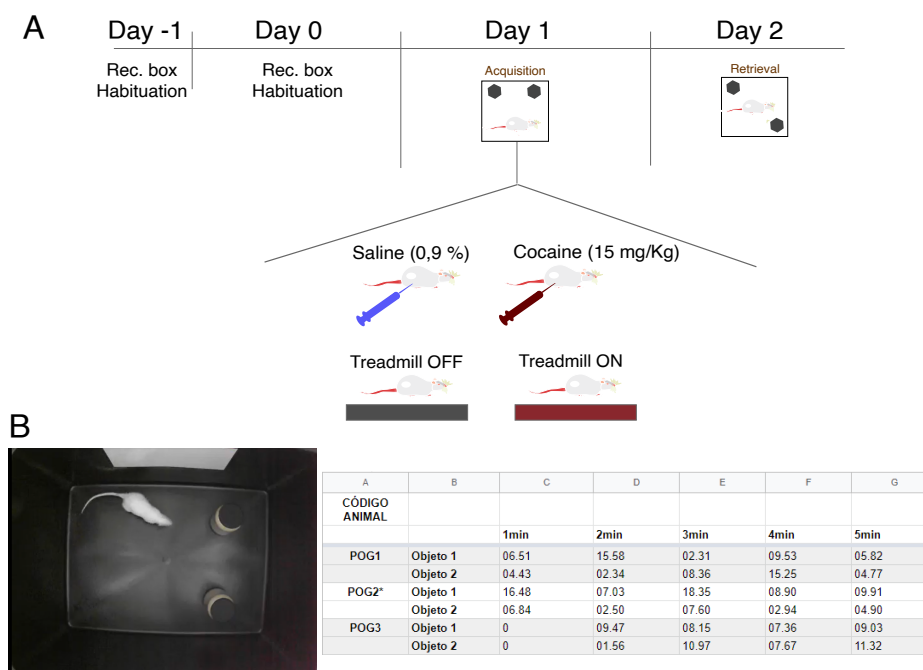
Após o processo de congelamento por submersão em isopentano, os encéfalos passaram por cortes transversais de 30 µm que foram realizados no criostato em busca das regiões de interesse mPFC e CA1, por toda a faixa anteroposterior em que as lesões foram realizadas. Esses cortes foram colocados em solução tampão PBS e, com o auxílio de pinças, foram posicionados em lâminas previamente 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 em microscópio, e com a ajuda de uma lente com aumento de até 40x foi realizada a confirmação. Todas as imagens que possibilitaram a visualização da lesão dos eletrodos, foram fotografadas e usadas para validação da posição dos eletrodos nas regiões alvo.

3.6 Teste de localização de objetos

O teste de localização de objetos é utilizado como uma ferramenta para avaliação da consolidação da memória durante o sono. Por exemplo, Maingret et al (2016) mostraram 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 min, comparado com a situação na qual os animais exploraram por 3 min. 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 min durante o treino do dia anterior. O teste adaptado por nós, esquematizado na Figura 5, consiste em, inicialmente, dois dias de aclimati-

zação por 20 minutos em uma caixa de 70 x 50 cm com uma pista visual (folha de papel branco) colada a uma das paredes longas. Em seguida, no Dia 1, os animais foram colocados na caixa e foi permitida a livre exploração de toda a arena com os dois objetos idênticos por 20 minutos. Após este tempo, os objetos foram removidos e os animais, que haviam sido previamente separados em 4 grupos de tratamento (Salina 0,9%, Cocaína 15 mg/kg, Esteira ON e Esteira OFF) passaram por seus respectivos tratamentos. Os animais cocaína diluída em veículo e os animais salina receberam seus respectivos tratamentos por via intraperitoneal e permaneceram na arena onde realizaram o teste comportamental por 3 horas após o tratamento. Os animais dos grupos esteira foram removidos da arena e colocados em esteira por 3 horas, sendo um dos grupos com a esteira desligada e o outro grupo com esteira ligada conforme o mesmo protocolo detalhado no experimento eletrofisiológico. No dia 3 os animais foram reintroduzidos na mesma arena, com um dos objetos do dia anterior tendo sido deslocado para uma nova posição referente ao dia 2, e foi permitida a exploração por 5 minutos.

Figura 5: (A): Esquematização do desenho experimental de Teste de Reconhecimento de Objeto, com dias -1 e 0 como dias de habituação ao ambiente do teste, Dia 1 a aquisição de memória por exploração livre dos objetos por 20 minutos e Dia 3 a evocação por 5 minutos, com um dos objetos deslocados (Maingret, 2016; Gusmão et al, 2020); (B): Frame representativo de etapa de aquisição de memória durante o teste de reconhecimento de objetos e tabela representativa com dos tempos de exploração de cada objeto, separados por minuto.



Fonte: Autor

4 ANÁLISE DE DADOS

4.1 Quantificação e análise de experimentos comportamentais

Os vídeos das tarefas comportamentais foram avaliados por 2 experimentadores independentes sem conhecimento das condições e grupos dos testes, para quantificação do tempo de exploração de cada objeto quantificado separadamente em blocos minuto a minuto de vídeo. Tipicamente, ratos tendem a preferir estímulos novos em detrimento de estímulos conhecidos, assim é possível inferir o aprendizado e memória de localização de objetos em ratos pela relação do tempo em que os animais despendem explorando o objeto deslocado, que é tratado como estímulo novo, e o tempo de exploração do objeto estável. Assim, o desempenho na tarefa comportamental foi mensurado através do cálculo de um índice de discriminação (DI), este sendo definido como o tempo despendido explorando o objeto deslocado dividido pelo tempo total de exploração de ambos os objetos. Foi considerado comportamento exploratório quando os animais se encontravam com a cabeça orientada para o objeto e com o focinho a uma distância mínima de 2 cm ou em contato direto com os objetos.

4.2 Pré-processamento

Os registros de LFP e EMG (eletromiograma) foram processados e analisados utilizando a ferramenta MATLAB® R2021b (MathWorks®). Os sinais passaram por:

1. Remoção de quaisquer tendências constantes existentes (função detrend)
2. Reamostragem de 4 kHz para 800 Hz (função resample)
3. Filtragem por um filtro passa-banda (LFPs - 0.7-250 Hz; EMG = 80-300 Hz)

Para a classificação dos estados do ciclo sono vigília: filtro butterworth de 2º ordem (funções butter e filtfilt)

Para demais análises: two-way least-squares FIR filtering de 3426º ordem (função eegfilt)

4. Separação em épocas de 10 segundos (função reshape)

Em seguida a classificação das épocas de 10 segundos e análise inicial de arquitetura do sono foi realizada utilizando uma toolbox de código aberto para a classificação de sono de roedores desenvolvido por nosso grupo (Mendes et al, 2021).

4.3 Arquitetura do sono

Todos os dias de registro por animal foram divididos em períodos da manhã e tarde. O período da tarde foi definido como tendo o limite inicial de 4,5 horas antes do término do registro e o limite final como o próprio término do registro no dia em questão. Já o período da manhã foi definido como as primeiras 4 horas de registro. A percentagem 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). A incidência de cada estágio do ciclo sono-vigília por minuto (número de bouts por minuto: bout é definido como 3 épocas de 10 segundos em sequência classificadas como pertencendo a um mesmo estágio) foi calculada de acordo com o critério mínimo de 2 épocas de 10 segundos sucessivas (bouts). Portanto, o tempo mínimo para um bout é de 20 segundos e a incidência de cada fase é 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 cada fase.

4.4 Latência para o sono

As épocas de 10 segundos foram divididas entre seus respectivos dias e a latência do 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. 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.

4.5 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, totalizando 6 períodos por dia. As densidades espectrais de potência dos LFPs de CA1 e mPFC foram estimadas utilizando o método de Welch (Welch, 1967). Para isso, utilizamos a função `pwelch` do MATLAB com os seguintes parâmetros: WINDOW = Taxa de amostragem; NOVERLAP = 0; NFFT = 2 x tamanho da época, ou seja: $(2 * \max(\text{size}(\text{lfp})))$, onde `lfp` é um vetor contendo 10s de registro amostrado a 800 Hz. Este valor de NFFT fornece uma resolução de frequência de 0,05 Hz. Para evitar que

o ruído da rede elétrica afetasse as análises, os valores de potência em torno de 60 Hz (58 a 62 Hz) foram substituídos por NaN. Para normalização, a potência em cada bin de 0,05 Hz foi dividida pela soma da potência total de cada sinal (excluindo os valores em torno de 60 Hz). Para cada época, foram as potências foram integradas nas bandas de Delta (1-4 Hz), teta (5-12 Hz) e gamma (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 Esteira ON, 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.

4.6 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 concatenados 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 bins de 0.0196 Hz (`nfft = 512`);

4.7 Coerência espectral

A coerência espectral entre CA1 e mPFC foi estimada para cada época de 10s utilizando a função `mscohere` do MATLAB com os seguintes parâmetros: `NFFT=212`; `WINDOW= []`; `Fs=800`; `NOVERLAP=[]`. A magnitude da coerência espectral varia de 0 a 1 para cada bin de frequência e é estimada por $C_{xy} = \frac{(\text{abs}(P_{xy})^2)}{(P_{xx} * P_{yy})}$, onde P_{xx} e P_{yy} representam a densidade potência espectral de potência (PSD) calculada por método de Welch para o sinal x (CA1) e y (mPFC), respectivamente. A variável P_{xy} é obtida por meio da correlação cruzada das PSDs estimadas a partir dos sinais x e y.

4.8 Coerência de fase

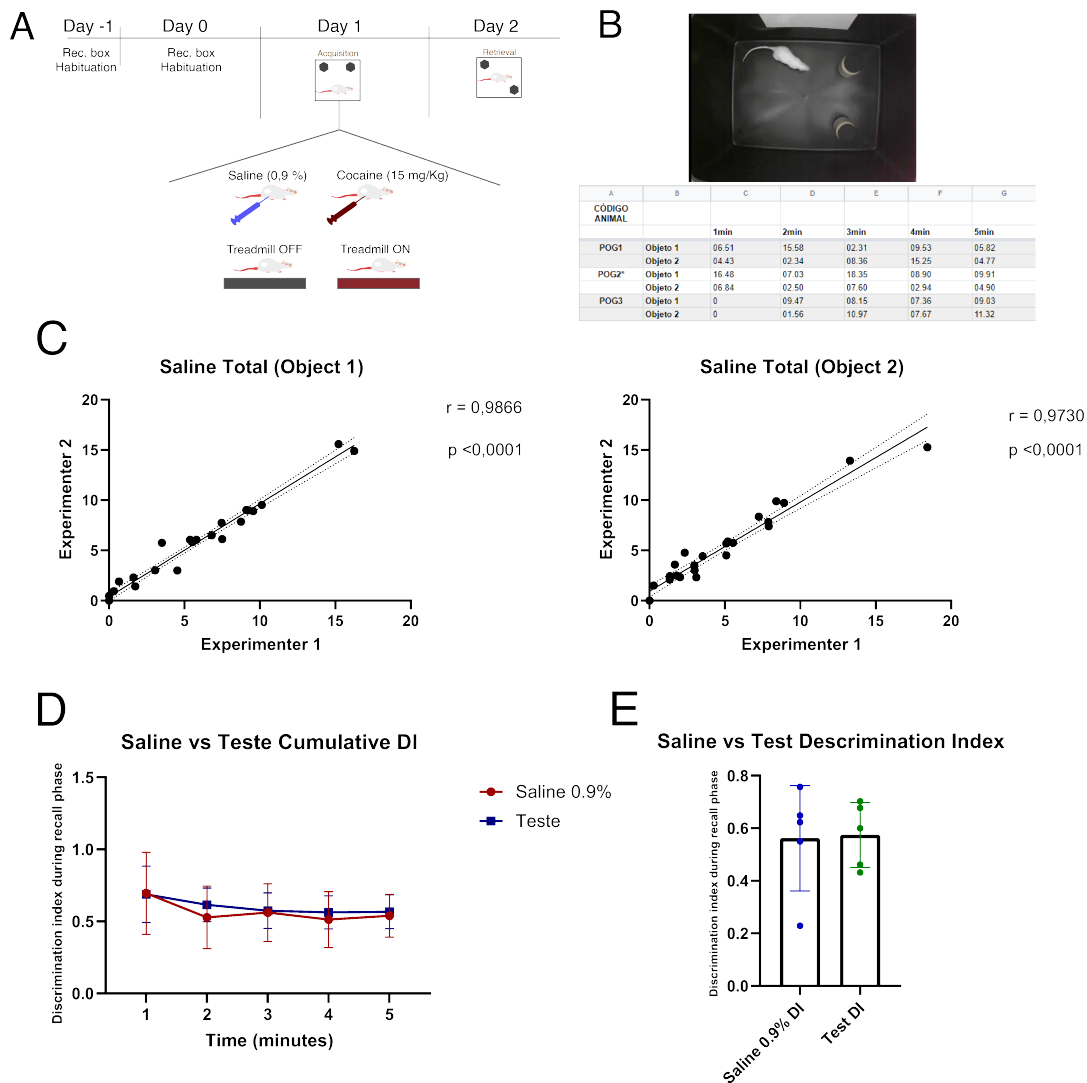
A coerência de fase entre CA1 e mPFC foi estimada para cada época de 10 s utilizando a função `coherencysegc` do pacote Chronux (<http://chronux.org/>) com os seguintes parâmetros: `params.Fs=800`; `params.fpass=[0 50]`; `params.tapers=[3 5]`; `params.pad=0`; `params.err=[2 0.05]`; `% 1=theoretical; 2=Jackknife; params.trialave=0`.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da cocaína e protocolo de privação de sono induzido por esteira sobre a memória de localização de objetos

Para a validação dos experimentos comportamentais, os tempos de exploração de cada objeto durante a fase de evocação de memória foram quantificados por dois experimentadores independentes e cegos às condições experimentais (Figura 6B). Observamos uma forte correlação positiva entre os pesquisadores para a variação do tempo de exploração mensurado para ambos os objetos [Objeto 1: $r(23) = .98, p < .0001$; Objeto 2: $r(23) = .97, p < .0001$] (Figura 6C). Ainda, ao comparar a dinâmica e os índices de discriminação dos animais do grupo controle salina aos animais de experimento piloto de padronização do teste comportamental em nosso laboratório (Figura 6D e E) fomos capazes de indicar uma alta robustez e reprodutibilidade do protocolo adaptado por nós. Interessantemente, ao analisar a dinâmica dos índices de discriminação entre objeto deslocado e estável, foi notada uma maior taxa de discriminação dentro os primeiros três minutos da sessão de evocação de memória (Figura 6D), consistente com os dados reportados por Maingret et al. 2016 onde os animais durante a tarefa de reconhecimento apresentam uma maior exploração dos objetos durante os primeiros minutos da tarefa, gradativamente decaindo até um DI próximo de 0,5.

Figura 6: (A): Padronização e validação do teste de reconhecimento de objetos; Esquema representativo do desenho experimental; (B): Frame representativo de etapa de aquisição de memória durante o teste de reconhecimento de objetos e tabela representativa com dos tempos de exploração de cada objeto, separados por minuto; (C): Teste de correlação de Pearson e regressão linear simples entre os tempos de exploração minuto a minuto de ambos os objetos; a relação da variação de tempo de exploração medida por ambos os experimentadores independentes é fortemente positivamente correlacionada para ambos os objetos [Objeto 1: $r(23) = .98$, $p < .0001$; Objeto 2: $r(23) = .97$, $p < .0001$]. (D) Dinâmica do índice de discriminação (DI) de animais salina vs animais teste piloto para a tarefa comportamental; animais em ambos os grupos apresentaram um DI mais elevado durante os primeiros três minutos da tarefa. Os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si e apresentaram valores próximos, sendo um indício de robustez e rigurosidade do método de quantificação manual implementado.

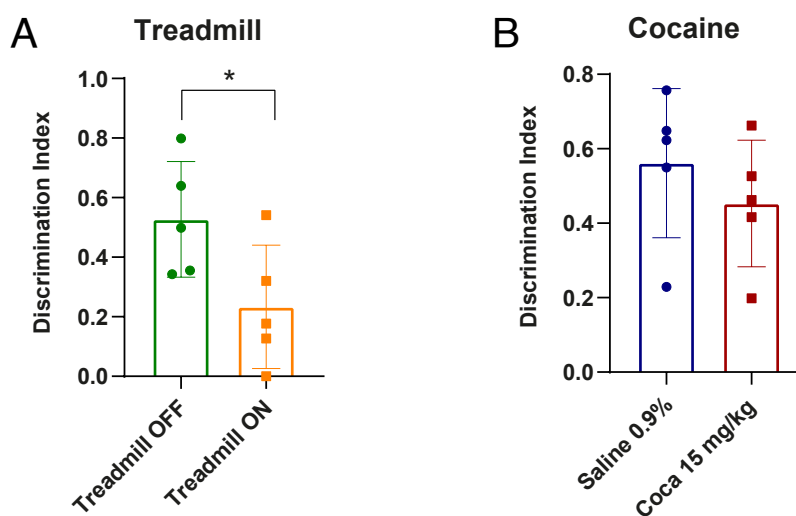


Fonte: Autor

Com isso em vista, calculamos os índices de discriminação dentro dos primeiros três minutos da fase de evocação de memória para os animais dos grupos salina, Cocaína 15 mg/kg, Esteira ON e Esteira OFF. Surpreendentemente, enquanto os animais do grupo Esteira ON apresentaram uma aparente inversão de preferência de exploração, passando mais tempo explorando

o objeto conhecido quando comparados ao grupo Esteira OFF($t(8) = 2.316$, $p = .0492$.) (Figura 7), os animais cocaína não apresentaram o mesmo perfil na tarefa quando comparados ao grupo salina ($t(8) = .9213$, $p = .3839$.) (Figura 7). Existe um corpo de trabalhos na literatura que apontam que baixas doses de cocaína podem levar a um aumento de desempenho em tarefas de memória, assim como relatos auto reportados de pacientes que sentem menos fadiga após trabalharem ou estudarem sob efeito de cocaína, mesmo que sob condições de privação de sono induzidos pela droga (Woolverton e Johnson, 1992; Kalivas et. al., 1998; Angarita, 2016). Apesar de não evidenciar uma melhora no desempenho da tarefa, nossos resultados apontam para um possível efeito atenuante na queda de desempenho na tarefa comportamental induzida por privação de sono em animais tratados com cocaína. Seguindo esta linha, nos perguntamos de que maneira, em uma perspectiva eletrofisiológica, o efeito da cocaína sobre o sono se diferencia dos efeitos de privação de sono induzidos pela esteira, em particular em sua arquitetura e nos diferentes estágios do sono. Assim, demos início aos experimentos eletrofisiológicos descritos anteriormente na seção 3.4 (Figura 4).

Figura 7: (A): Efeito de dose aguda de Cocaína 15 mg/kg e locomoção induzida por esteira à 2 cm/s sob o desempenho em tarefa de reconhecimento de objetos; Comparação do índice de discriminação nos 3 primeiros minutos da fase de evocação Esteira OFF vs Esteira ON; os animais do grupo ON apresentaram uma diminuição de desempenho estatisticamente significativa em comparação ao grupo OFF ($t(8) = 2.316$, $p = .0492$.) (B): Comparação do índice de discriminação nos 3 primeiros minutos da fase de evocação-Salina vs Cocaína 15 mg/Kg; houve uma diminuição no desempenho dos animais do grupo cocaína se comparado ao grupo salina, entretanto a diferença não é estatisticamente significativa.



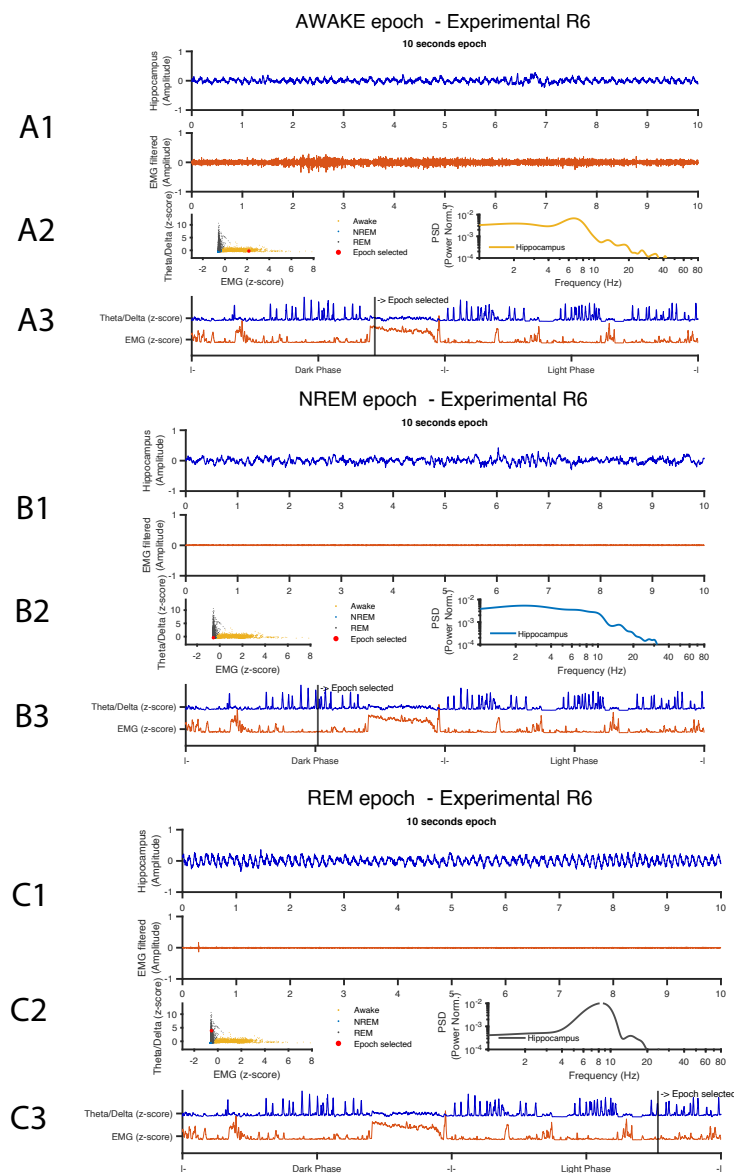
Fonte: Autor

5.2 Caracterização eletrofisiológica dos estados comportamentais durante o ciclo sono-vigília

Após a etapa de pré-processamento utilizando scripts desenvolvidos sob demanda, os dados passaram pela toolbox de classificação de sono desenvolvida por nosso grupo (Mendes et al, 2021), onde o RMS do eletromiograma (EMG) juntamente com a razão Theta/Delta do LFP hipocampal normalizados por z-score são utilizados para a diferenciação entre estados acordado, nREM e REM, permitindo assim a obtenção de épocas representativas de cada estágio (Figura 8). Janelas com razão Theta/Delta com valores mais elevados e RMS de EMG baixo foram classificadas e clusterizadas como pertencentes à sono REM, onde há redução da atividade muscular evidenciada pela redução da amplitude do EMG e dessincronização da atividade oscilatória dos registros de LFP, com um aumento na frequência das oscilações dos registros de LFP assemelhando-se à

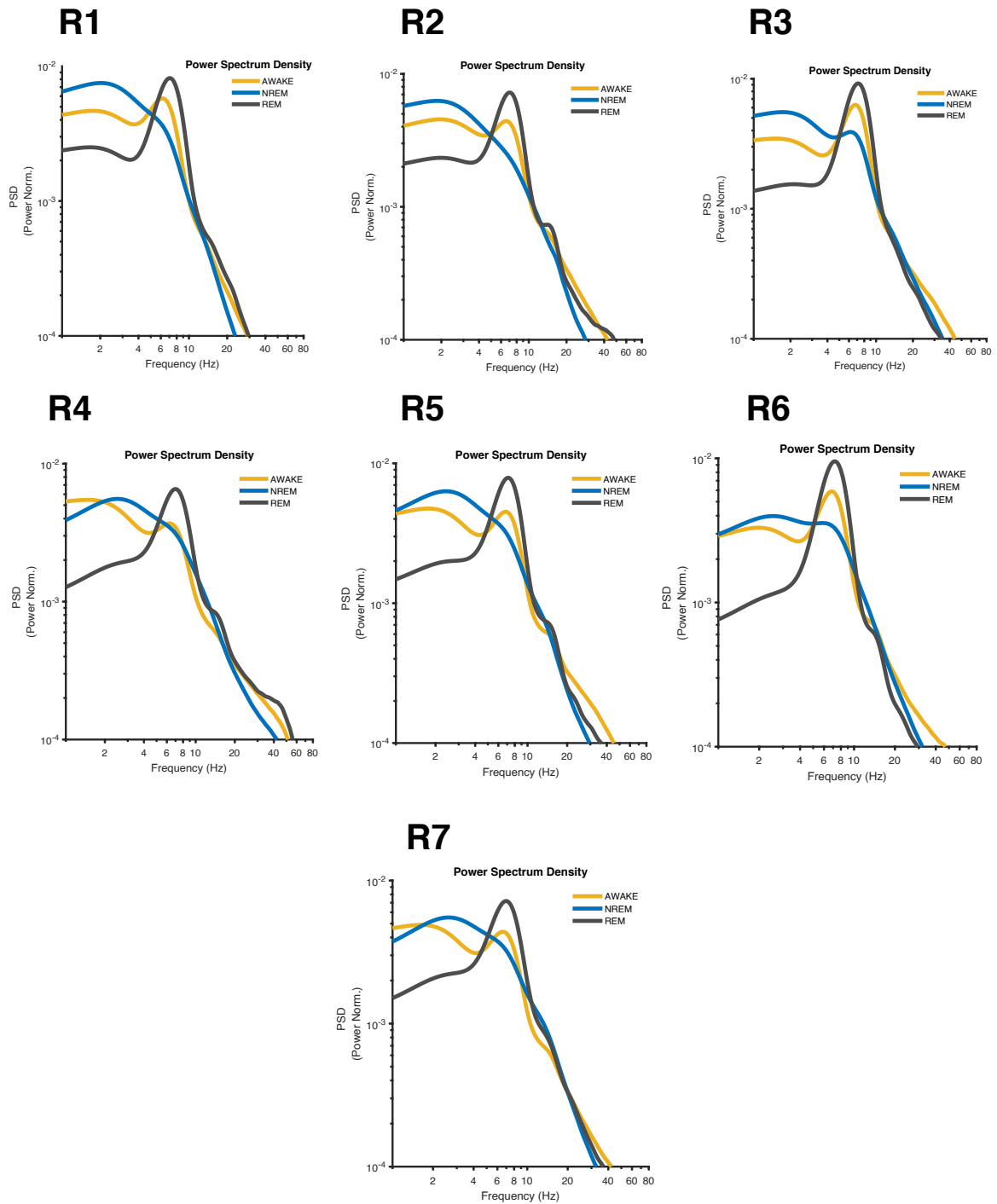
atividade oscilatória encontrada no decorrer de épocas de comportamento exploratório durante a vigília. Já janelas que apresentaram um valor de Theta/Delta mais baixo são classificadas como NREM nos quais há uma sincronização da atividade oscilatória, havendo um aumento na amplitude e uma redução da frequência das oscilações no mPFC e em CA1. Ainda, pudemos observar uma redução da amplitude do EMG, indicando uma redução da atividade muscular. As janelas classificadas como acordado apresentaram RMS de EMG com maior magnitude (Figura 8 - A2, B2 e C2). Ao final da classificação, as densidades de potência espectrais (PSDs) foram estimadas para cada estado, permitindo assim avaliar quais são os componentes do sinal de LFP mais prevalentes para cada um dos estágios (Figura 8 - A2, B2, C2; Figura 9). Por fim, construímos hipnogramas para avaliação dos efeitos dos tratamentos em questão sobre a arquitetura do sono de cada animal. Particularmente, observamos que no mPFC há uma predominância de componentes de baixa frequência (< 4 Hz) durante NREM, juntamente de um pico na faixa correspondente a Theta (5 - 12 Hz) na média das épocas de sono REM e um aumento de potência na mesma faixa de frequência na média das épocas acordadas (WK) (Figura 9). Já em CA1, há uma predominância de componentes de baixa frequência (< 4 Hz) na média das épocas NREM. Como esperado, também observamos um pico proeminente na faixa correspondente a theta na média das épocas de sono REM. Durante WK, um pico em theta ainda encontra-se proeminente, porém com potência reduzida quando comparado a REM. Assim, concluímos 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).

Figura 8: Épocas representativas fornecidas pela toolbox para classificação de sono em roedores; Janelas de 10 segundos representativas de um mesmo animal (Esteira R6) para cada um dos estágios do sono; A1, B1 e C1: Sinal bruto de LFP hippocampal e EMG; Repare o perfil mais lentificado em nREM quando comparado a REM, onde o traçado apresenta oscilações mais rápidas. O sinal de EMG é visto apenas em A. A2, B2 e C2: Scatter plot das épocas de registro e densidade espectral de potência (PSD); através da relação Theta/Delta e do RMS do EMG normalizados por z-score é possível clusterizar as épocas de cada animal em grupos que representam cada um dos estágios, onde REM possui valores mais elevados da razão Theta/Delta quando comparado a nREM, e estado acordado tendo valores mais elevados de RMS do EMG do que ambos. As PSDs permitem determinar qual componente de sinal é mais prevalente em cada estágio, sendo oscilações Theta (5 - 12 Hz) mais marcantes em REM enquanto Delta (1 - 4 Hz) é mais prevalente em nREM. A3, B3 e C3: Valores da razão Theta/Delta e RMS do EMG normalizados por z-score ao longo do registro.



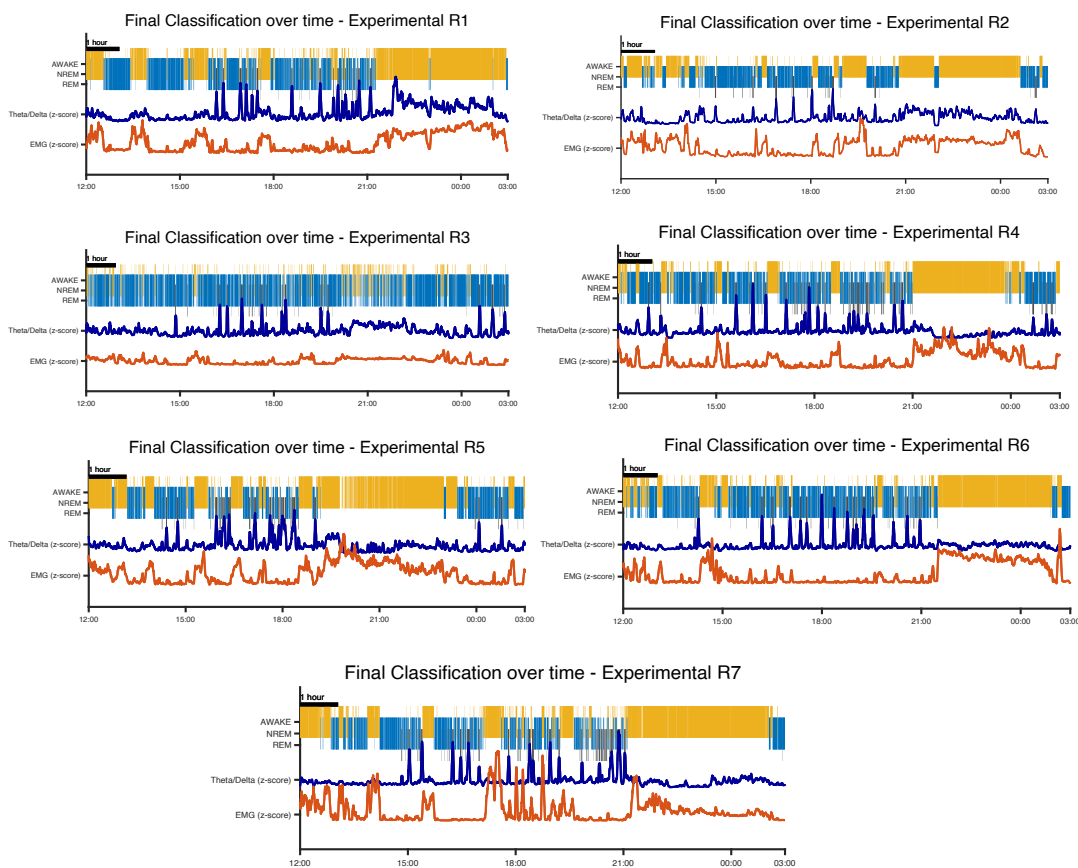
Fonte: Autor

Figura 9: Densidade espectral de potência dos animais esteira demonstrando a contribuição de cada componente de sinal para cada um dos estágios do sono, tendo o sono nREM uma prevalência de contribuição de Delta (1 - 4 Hz), REM uma prevalência de Theta (5 - 12 Hz).



Fonte: Autor

Figura 10: Hipnogramas representativos de arquitetura de sono dos animais Esteira ON utilizando o toolbox de classificação; evidencia-se durante o período correspondente ao início do segundo dia (final da barra superior) o período no qual os animais foram privados de sono. O animal R3 apresentou dados com valores inesperadamente altos que interferiram em sua classificação, sendo muito provavelmente um outlier.



Fonte: Autor

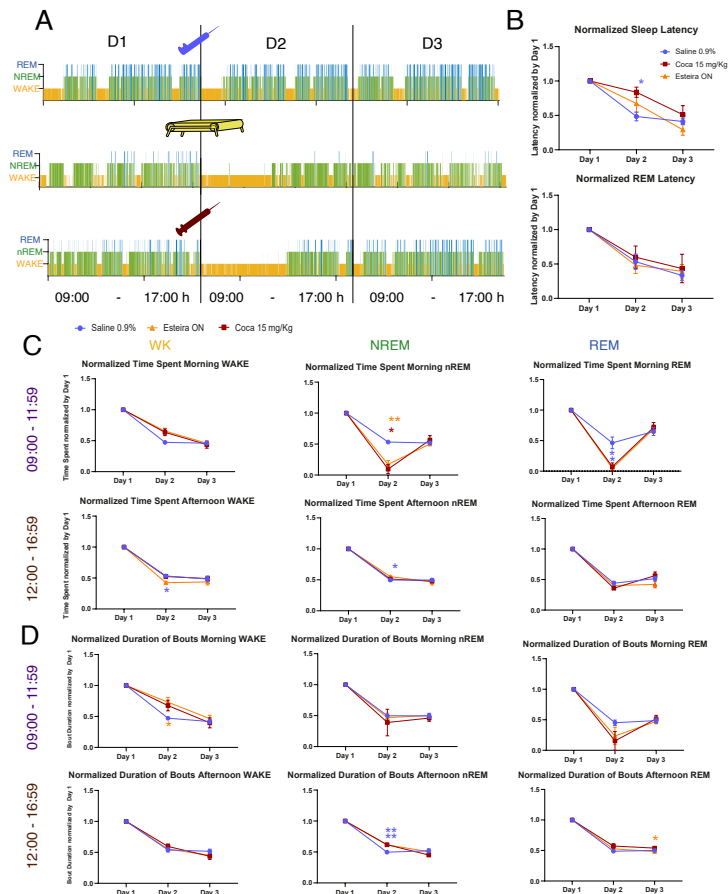
5.3 Efeitos da cocaína e da locomoção induzida por esteira sobre a arquitetura do sono

Primeiramente, nosso foco foi verificar se o protocolo de esteira desenvolvido foi capaz de privar os animais de sono por um período de tempo similar ao induzido por uma dose aguda de cocaína 15 mg/kg, ou seja, por aproximadamente 3 horas. Foi previamente descrita em literatura a capacidade de protocolos que fazem uso de locomoção induzida por esteira para promover a fragmentação ou até mesmo a privação completa de sono, com base em sua velocidade de atividade e períodos ativos (Tartar et al., 2009). Similarmente, também é descrita a capacidade de cocaína de causar um aumento na latência para início do sono de maneira dose-dependente (Knapp et al, 2007; Bjorness, Greene; 2018). De fato, ao comparar os hipnogramas a partir da classificação das janelas de 10 segundos obtidas, evidencia-se um período de cerca de 3 ho-

ras no começo do segundo dia de experimentação no qual as janelas majoritariamente foram classificadas como estado acordado (Figura 11A), permitindo assim demonstrar que o protocolo de locomoção induzido por esteira foi capaz de produzir um estado sustentado de alerta nos animais similar ao licitado por cocaína. Ao prosseguirmos com as análises estatísticas de arquitetura de sono, verificamos que ambos os grupos experimentais tiveram um aumento para a latência do início do sono no segundo dia de registro, sendo este aumento estatisticamente significativo para o grupo cocaína quando comparado ao grupo salina, contudo sem diferença estatisticamente significativa entre o Dia 1 (linha de base) e o Dia 3 (pós-tratamento) [SAL(D2) vs COCA-15(D2): +64,33%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; tempo : $F(1,353, 17,59) = 42,29$, $P < 0,0001$, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p = 0,0212$] (Figura 11B). Estes dados reproduzem e corroboram aqueles encontrados na literatura e produzidos por nós em estudo anterior (Bjorness, Greene; 2018; Gusmão et al, 2020). Ao analisar o tempo despendido em cada um dos estados WK, NREM e REM pelo período da manhã normalizados pelo primeiro dia de registro, não observamos diferença significativa para no tempo despendido em WK no Dia 2 para os animais Cocaína 15 mg/Kg e Esteira ON e, notadamente, uma redução significativa para ambos os grupos de tempo despendido em estado NREM [SAL(D2) vs COCA-15(D2): -82,04%; SAL(D2) vs Esteira ON(D2): -67,84%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(4, 26) = 12,42$, $p < 0,0001$, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p = 0,0130$, SAL(D2) vs Esteira ON(D2); $p = 0,0036$] (Figura 11 C). Similarmente, ambos os grupos de tratamento tiveram uma redução estatisticamente significativa no tempo despendido em REM pela manhã no Dia 2 [SAL(D2) vs COCA-15(D2): -84,19%; SAL(D2) vs Esteira ON(D2): -90,14%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo: $F(4, 26) = 6,219$, $p = 0,0012$, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p = 0,0232$, SAL(D2) vs Esteira ON(D2); $p = 0,0140$] (Figura 11 C) Nenhuma diferença significativa foi observada no tempo despendido em sono REM pela tarde. Interessantemente, os animais do grupo Esteira ON apresentaram um aumento significativo despendido em NREM no período da tarde do Dia 2 [SAL(D2) vs Esteira ON(D2): +10,88%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; tempo : $F(1,353, 17,59) = 42,29$, $P < 0,0001$, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs Esteira ON(D2); $p = 0,0212$], associado a uma diminuição significativa no tempo despendido em WK [SAL(D2) vs Esteira ON(D2): +20,42%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; tempo : $F(1,250, 16,25) = 266,0$, $P < 0,0001$, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs Esteira ON(D2); $p = 0,0190$] (Figura 11 C). Nenhuma diferença estatisticamente

significativa foi observada no tempo despendido em REM no período da tarde Concomitantemente, ao comparar a duração dos bouts de cada estágio dos animais tratamento com os animais do grupo salina pelo período da manhã, foi observada uma diminuição na duração de bouts WK em animais Esteira ON no segundo dia de registro [SAL(D2) vs Esteira ON(D2): -54,90%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; interação tratamento x tempo :F (4, 26) = 4,207, P = 0,0093, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs Esteira ON(D2); p = 0,0461], mas não para animais cocaína (Figura 11 D). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na duração de bouts de NREM e REM. Entretanto, no período da tarde, evidenciamos um aumento na duração de bouts de NREM em ambos os grupos tratamento quando comparados ao grupo Salina [SAL(D2) vs COCA-15(D2): +24,37%; SAL(D2) vs Esteira ON(D2): +23,95%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; Interação tratamento x tempo:F (4, 26) = 12,15, p < 0,0001, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs COCA-15(D2); p = 0,0062, SAL(D2) vs Esteira ON(D2); p = 0,0021] (Figura 11 D) Também foi evidenciada uma diferença estatisticamente significante na duração de bouts em REM no período da tarde entre os grupos Cocaína 15 mg/kg e Esteira ON [COCA-15(D3) vs Esteira ON(D3): +10,35%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; tempo :F (1,777, 23,10) = 1127, P<0,0001, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs Esteira ON(D2); p = 0,0469] (Figura 11 D). Os dados do presente estudo corroboram aqueles encontrados por Bjorness e Greene (2018) que, ao testarem os efeitos de diferentes doses de cocaína no comportamento de camundongos, também demonstraram uma queda significativa no tempo que os animais despenderam em estado NREM e REM, juntamente de um aumento significativo para WK.

Figura 11: Figura 11: Efeitos induzidos por tratamento com salina, cocaína 15 mg/kg e privação de sono induzida por esteira na arquitetura do sono dos animais: (A) Comparação direta entre o hipnograma ao longo dos 3 dias de experimentação em animal salina (seringa azul), animal Cocaína 15 mg/kg (seringa vermelha) e animal Esteira On (esteira amarela); Evidencia-se que cocaína e esteira foram capazes de provocar um período de privação de sono de duração similar (aproximadamente 3 horas) quando comparados ao grupo salina no dia 2. (B) Latência para o início do sono e para o sono REM normalizados pelo primeiro dia de registro (baseline); houve um aumento para a latência do sono dos animais dos grupos tratamento quando comparados ao grupo salina no segundo dia de registro, sendo a diferença entre o grupo cocaína e salina estatisticamente significativa; (C): Tempo despendido pelos animais de cada grupo nos diferentes estágios de sono (acordado, NREM e REM) normalizados pelo primeiro dia de registro; no período da manhã, houve diminuição significativa nos tempos despendidos em NREM para esteira e cocaína no segundo dia e também no tempo despendido em REM. Curiosamente, para o grupo Esteira ON, houve uma diminuição no tempo despendido em estado acordado no período da tarde do segundo dia (reportar anova) juntamente de um aumento no tempo despendido em NREM ; (D): Duração dos bouts de cada estágio do sono nos períodos da manhã e tarde normalizados pelo primeiro dia de registro; no período da manhã, houve um aumento significativo na duração de bouts de estado acordado no segundo dia , enquanto que pelo período da tarde houve um aumento significativo da duração dos bouts de NREM nos grupos cocaína e esteira quando comparados à salina . Ainda, no terceiro dia no período da tarde houve um aumento significativo da duração de bouts de REM no grupo cocaína quando comparados à esteira.



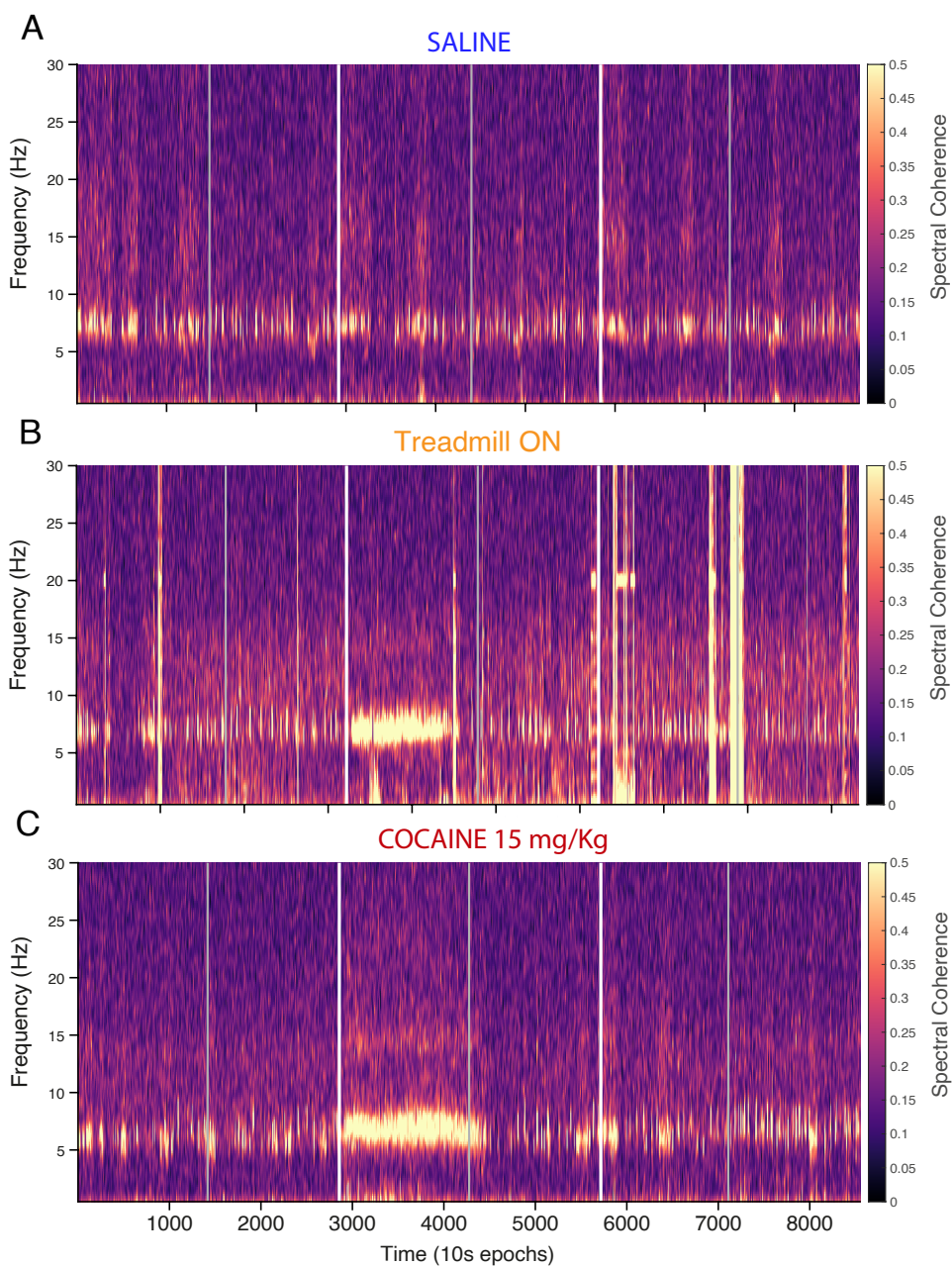
Fonte: Autor

5.4 Efeitos da cocaína e esteira sobre a coerência espectral e coerência de amplitude durante estado acordado

É evidenciado na literatura que a comunicação entre hipocampo e mPFC parece ser central para processos de aprendizado e consolidação de memória espacial (Tort et al., 2009; Skelin, Kili-ansk, McNaughton, 2019; Eschenko et al., 2008). Em específico, Benchanane et al. (2010), ao avaliarem a coerência em theta entre CA1 e mPFC em ratos durante aprendizagem de novas regras em labirinto em Y, observaram que a coerência em theta entre as duas regiões avaliadas atingia um valor máximo no ponto de decisão do labirinto (imediatamente antes da bifurcação dos braços). Ainda, este aumento de coerência foi reproduzido em animais anestesiados por meio de infusão intra-cerebral de dopamina (Benchanane et al. 2010), sugerindo um papel do neurotransmissor durante esse processo, que está implicado, comportamentalmente, em expectativa de recompensa (Schultz et al., 1997). Mais recentemente, foi demonstrado que CPP induzida por cocaína, um modelo amplamente utilizado para avaliar comportamentos relacionados a dependência, está associada a aumento do acoplamento oscilatório entre hipocampo e NAc durante o sono (Sjulson et al., 2018). Em trabalho anterior, nosso grupo reportou aumento de acoplamento similar durante a fase acordado similar ao relatado na literatura em animais submetidos a tratamento com cocaína 15 mg/kg e 2,5 mg/kg (Gusmão et al., 2020). Tendo isso em vista, assim como o estado de vigília sustentado produzido pelo protocolo de esteira no vigente trabalho, além do aumento da duração dos bouts em estado acordado durante o período da manhã do Dia 2 em animais Esteira ON, resolvemos investigar possíveis alterações de acoplamento elicitados pela privação de sono induzida por esteira e comparar àquelas induzidas por cocaína. Para tal, selecionamos as primeiras 4 horas de registro do Dia 2, considerando assim o período no qual os animais se encontrariam sob efeito de tratamento com cocaína e privação de sono induzida por esteira. A Figura 12 ilustra coerogramas representativos dos grupos Salina, Cocaína e Esteira ON ao longo dos três dias de registro; as linhas brancas demarcam os diferentes dias de registro enquanto as linhas cinzas marcam a transição de período da manhã e tarde. Durante o início manhã do segundo dia, é possível notar um aumento de coerência na faixa de frequência entre 5 e 12 Hz (theta) nos grupos Cocaína e Esteira ON durante o período de tempo despendido em hiperlocomoção (Cocaína) e privação de sono induzida por esteira (Esteira ON). Ao comparar as PSDs dos diferentes grupos durante o estado acordado, os animais do grupo Cocaína 15 mg/kg aparentam apresentar uma maior contribuição de delta nos dias 2 e 3 quando comparados ao Dia 1 no mPFC (Figura 13 A1), enquanto os animais Esteira

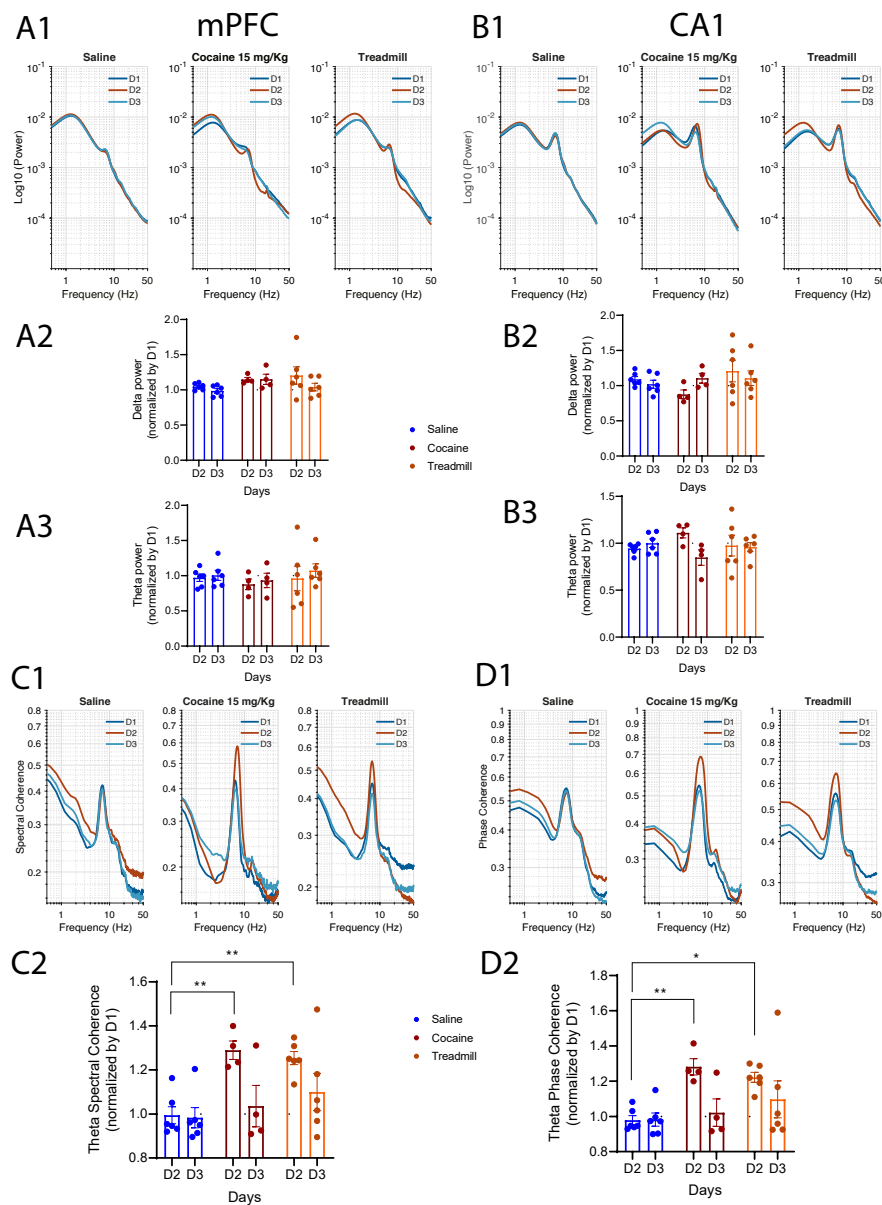
ON parecem ter uma maior contribuição na faixa de delta no Dia 3 (Figura 13 A1). Em CA1, os animais Cocaína 15 mg/kg aparentam apresentar um aumento de contribuição em theta no Dia 2 assim como um aumento de delta no Dia 3 (Figura 13 B1), enquanto os animais Esteira ON parecem apresentar um aumento na contribuição de delta e theta no Dia 3 (Figura 13 B1). Entretanto, ao comparar estatisticamente as potências de delta normalizadas pelo Dia 1 entre os diferentes grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no mPFC [Anova de duas vias de medidas repetidas; tratamento: 12,30%; $F(2, 13) = 1,534$, $p = 0,2524$] e em CA1 [Anova de duas vias de medidas repetidas; tratamento: 8,938%; $F(2, 13) = 2,364$, $p = 0,1331$] (Figura 13 A2 e B2), assim como não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na potência de theta nas duas regiões entre grupos [mPFC: Anova de duas vias de medidas repetidas; tratamento: 3,570%; $F(2, 13) = 0,3295$, $p = 0,7251$] [CA1: Anova de duas vias de medidas repetidas; tratamento: 0,08607%; $F(2, 13) = 0,01497$, $p = 0,9852$] (Figuras 13 A3 e B3). Ao comparar a coerência espectral e de fase dos diferentes componentes de sinal nos grupos experimentais, é possível observar um aumento marcante na coerência espectral na faixa de theta no Dia 2 de registro em animais Cocaína 15 mg/kg e Esteira ON quando comparados ao grupo Salina (Figura 13 C1), assim como um aumento notável na coerência de fase de theta nos mesmos grupos comparados à salina (Figura 13 D1). De fato, ao normalizar os valores de coerência dos grupos pelo primeiro dia de registro baseline, obtivemos uma diferença estatisticamente significativa para coerência espectral de theta entre o grupo Cocaína 15 mg/kg e Salina e Esteira ON e Salina [SAL(D2) vs COCA-15(D2): +29,66%; SAL(D2) vs Esteira ON(D2): +26,11%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; tempo: $F(1, 13) = 9,909$, $p = 0,0077$, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p = 0,0063$, SAL(D2) vs Esteira ON(D2); $p = 0,0072$] (Figura 13 C2) e de coerência de fase em theta para animais Cocaína e Esteira ON [SAL(D2) vs COCA-15(D2): +30,91%; SAL(D2) vs Esteira ON(D2): +24,81%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; tempo: $F(1, 13) = 10,34$, $p = 0,0068$, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p = 0,0071$, SAL(D2) vs Esteira ON(D2); $p = 0,0162$] (Figura 13 D2). Desta maneira, nossos resultados são consistentes aos reportados anteriormente por nosso grupo e aqueles encontrados na literatura (Benchanane et al. 2010, Gusmão et al., 2020).

Figura 12: Coerogramas representativos dos grupos Salina, Cocaína e Esteira ON ao longo dos três dias de registro; as linhas brancas demarcam os diferentes dias de registro enquanto as linhas cinzas marcam a transição de período da manhã e tarde. Durante o início manhã do segundo dia, é possível notar um aumento de coerência na faixa de frequência entre 5 e 12 Hz (theta) nos grupos Cocaína e Esteira ON durante o período de tempo despendido em hiperlocomção (Cocaína) e privação de sono induzida por esteira (Esteira ON).



Fonte: Autor

Figura 13: Alterações de potência, coerência espectral e coerência de fase de theta em animais cocaína 15 mg/kg e Esteira ON comparados a animais salina na fase acordada; (A1, A2 e A3): PSDs de mPFC dos diferentes grupos nos três dias de registro; Esteira ON parece demonstrar uma maior potência em delta e theta no Dia 2 quando comparado ao dia 1, mas ao comparar as potências normalizadas entre grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes; (B1, B2 e B3): PSDs de CA1 dos diferentes grupos nos três dias de registro; ao primeiro olhar, o grupo cocaína aparenta ter uma maior contribuição de delta no Dia 3 quando comparado a seu Dia 1, e o grupo Esteira ON parece ter uma maior contribuição de delta e theta no Dia 2, mas novamente ao comparar os diferentes grupos entre si não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes; (C1 e C2): coerência espectral de theta nos diferentes grupos experimentais normalizados pelo primeiro dia de registro; os grupos cocaína e Esteira ON apresentaram um aumento evidente e significativo de coerência espectral em theta durante a fase acordada; (D1 e D2): coerência de fase em theta nos diferentes grupos experimentais normalizados pelo primeiro dia de registro; similarmente, os animais dos grupos tratamento cocaína e Esteira ON apresentaram um aumento significativo, ainda que menor, na coerência de fase em theta durante o período acordado.

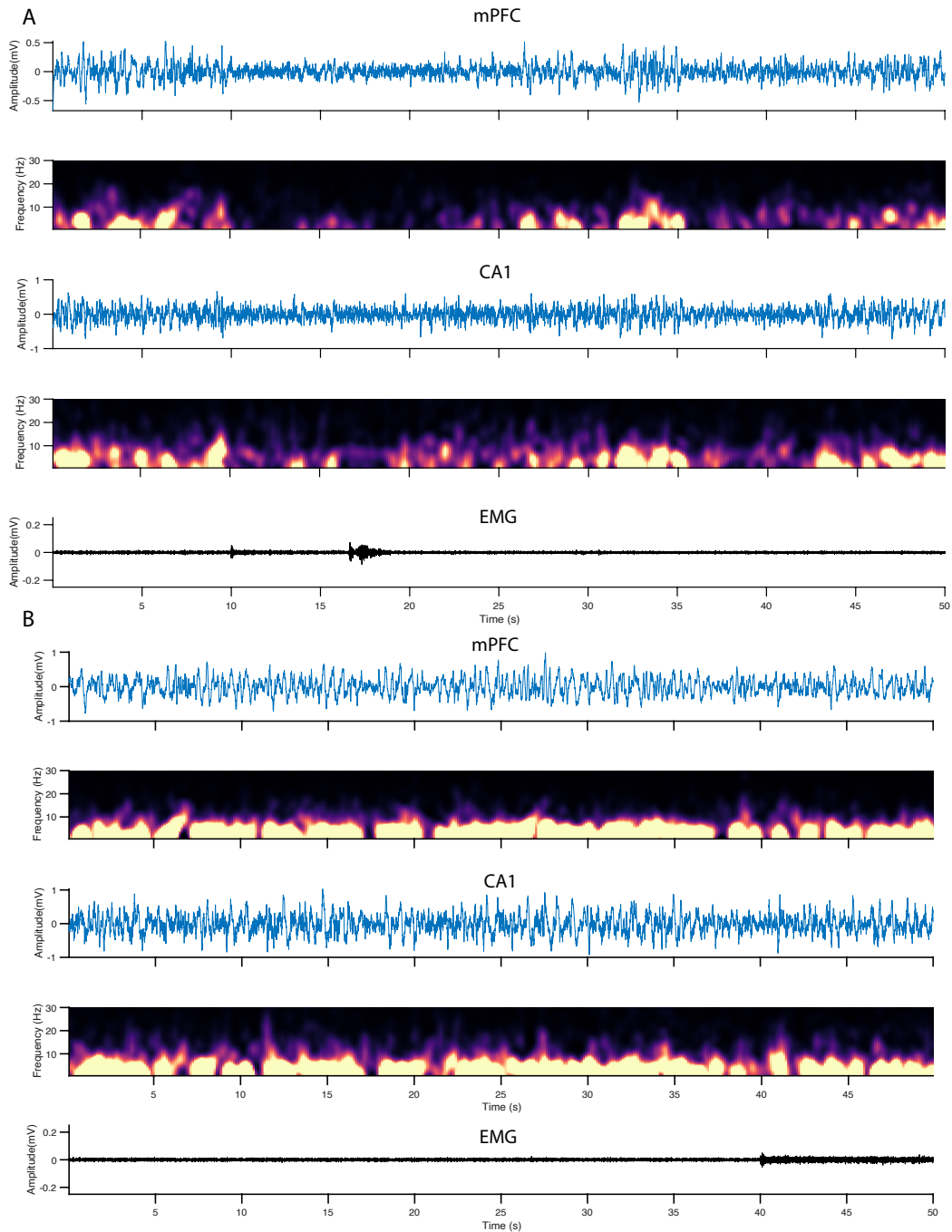


Fonte: Autor

5.5 Efeito rebote de ondas delta durante sono NREM induzido por cocaína e por protocolo de privação de sono por esteira

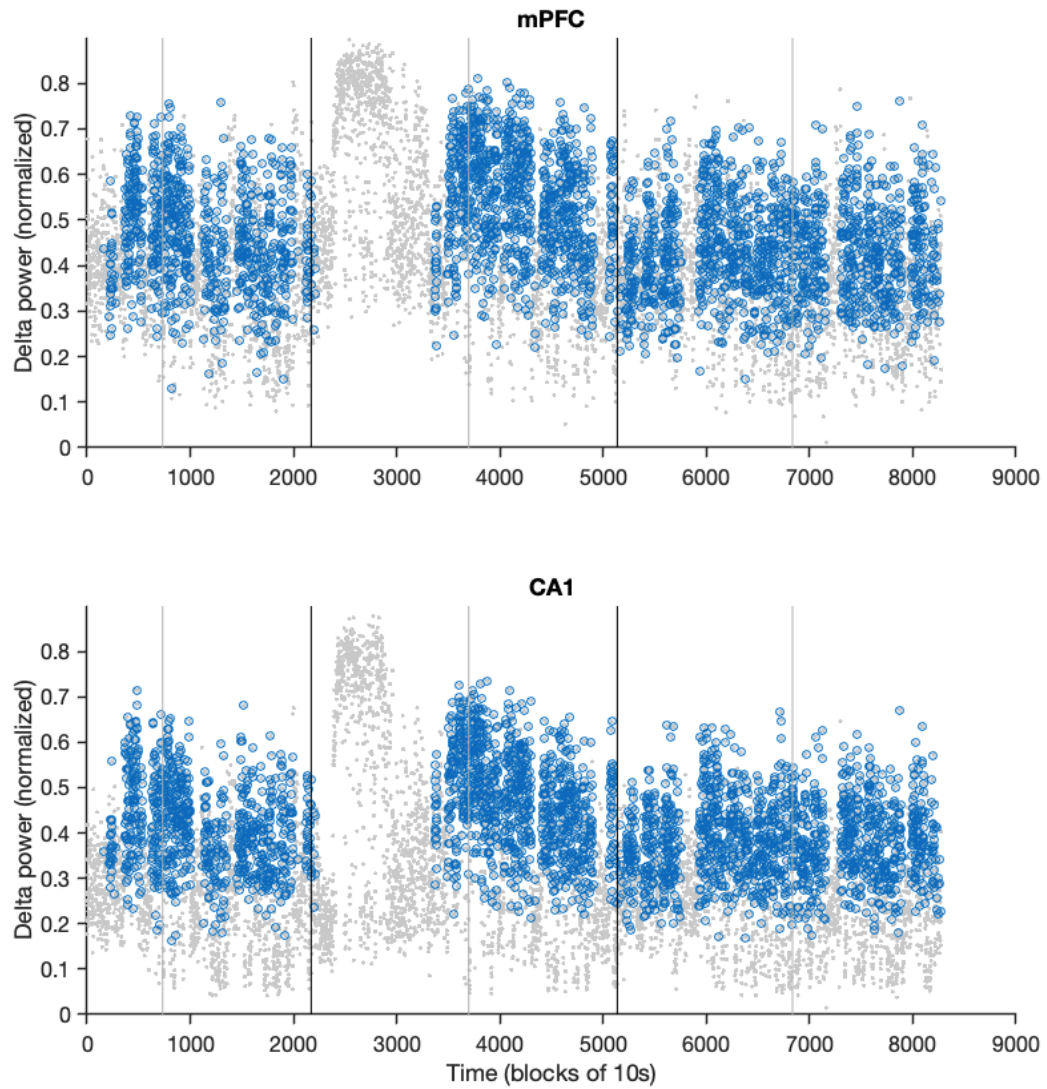
Foi demonstrado por Ponomarenko et al. (2003) que o tratamento agudo com anfetamina é capaz de produzir um aumento do tempo despendido em estado de alerta, seguido de um sono NREM com maior potência em delta associado a um aumento do número de ripples por minuto na região de CA1 do hipocampo. Similarmente, uma dose única de cocaína foi capaz de produzir um efeito rebote similar em delta, como relatado por Gusmão et al. (2020). Uma vez que este efeito rebote pode ser relevante para o processo de formação de memórias de associação entre droga e contexto, nosso estudo investigou se a privação de sono induzida por esteira também seria capaz de produzir tal fenômeno adaptativo. Para isso, selecionamos as últimas 4 horas de registro do Dia 2, considerando assim o período de sono subsequente ao tratamento com cocaína e privação de sono induzida por esteira. A Figura 14 contém 5 janelas de 10 segundos contíguas representando um animal Esteira ON (R5) durante o estado NREM. É possível notar uma predominância de componentes de frequência de 1 a 4 Hz (delta) e uma falta de atividade em EMG, característico de sono NREM. Ao comparar os espectrogramas dos dias 1 e 2, é possível notar um aumento de potência em delta no Dia 2 de registro tanto no mPFC quanto em CA1 (Figura 14 B, Figura 15). De forma interessante, é possível observar que este efeito rebote decai ao longo do sono subsequente à privação induzida pela esteira (Figura 15), a ponto de já apresentar valores de potência próximos aos encontrados no Dia 1 no começo do Dia 3.

Figura 14: Estados cerebrais representativos de épocas NREM no mPFC e em CA1 nos dias 1 e 2 de registro; os traçados de mPFC, CA1 e EMG representam a amplitude dos respectivos LFPs enquanto que os mapas de calor indicam a potência em diferentes frequências das componentes de sinal. (A): Brain state do Dia 1 de registro; Note uma predominância de componentes de frequência de 1 a 4 Hz (delta) e sem atividade em EMG, característico de sono NREM. (B): Brain state do Dia 2 de registro; comparativamente ao Dia 1, o segundo dia de registro apresenta uma maior potência em delta, evidenciando um possível efeito rebote.



Fonte: Autor

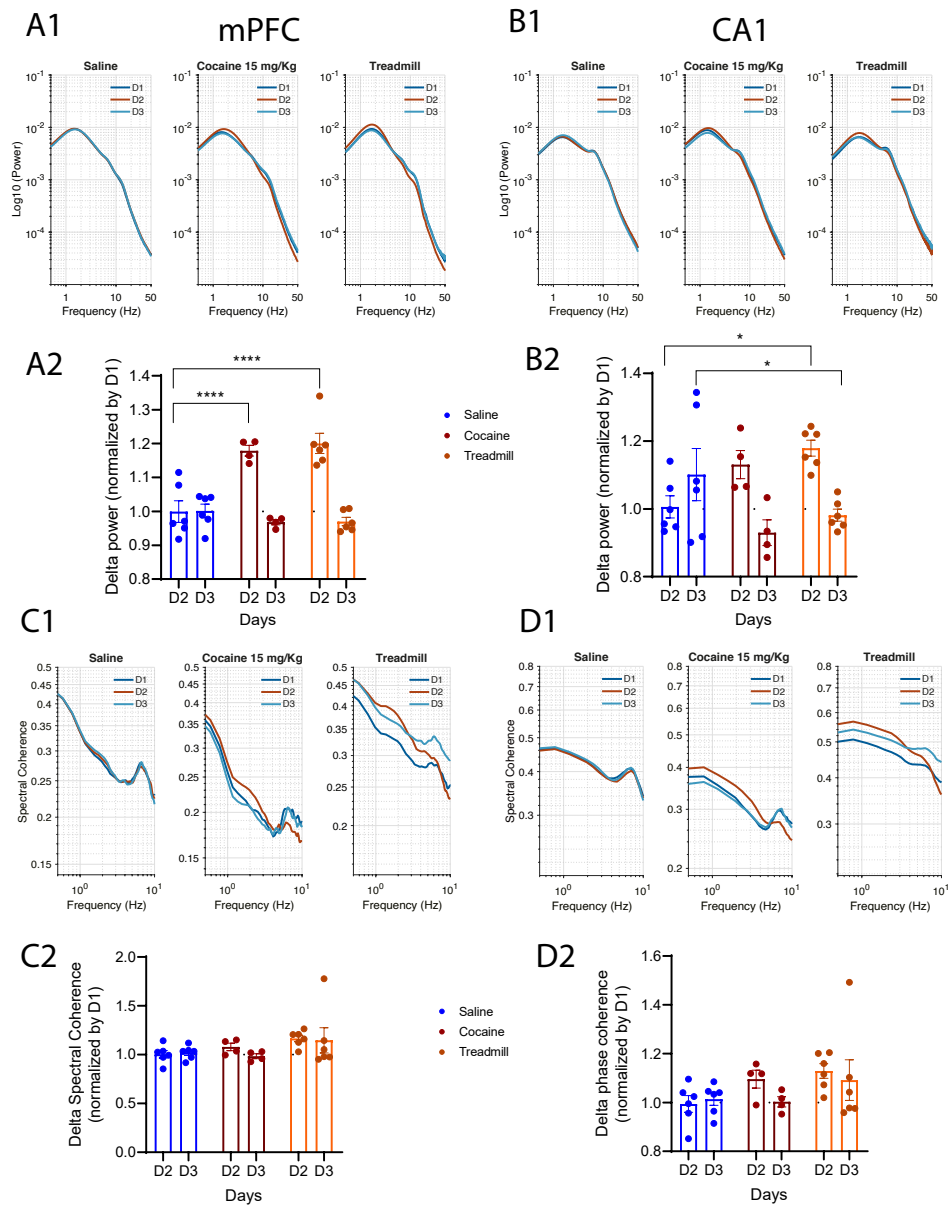
Figura 15: Classificação representativa evidenciando efeito rebote de delta em animal esteira; As épocas azuis são as que foram classificadas como NREM. O eixo Y mostra a potência em delta e o eixo x, épocas de 10s. As barras verticais pretas marcam os dias de registro e as barras verticais cinzas marcam as últimas 4h de registro para cada dia.



Fonte: Autor

Calculando as PSDs médias dos sinais do mPFC e CA1 em cada grupo, foi observado um aparente aumento da contribuição de delta do segundo dia de registro nos grupos Cocaína 15 mg/kg e Esteira ON (Figura 16 A1 e B1). De fato, ao comparar estatisticamente os valores de potência de delta normalizados pelo primeiro dia de registro entre os grupos Salina, Cocaína 15 mg/kg e Esteira ON, foi observado aumento significativo de potência nos animais do grupo Cocaína e Esteira ON comparados aos animais Salina no Dia 2 no mPFC [SAL(D2) vs COCA-15(D2): +17,98%; SAL(D2) vs Esteira ON(D2): +20,13%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; interação tratamento x tempo: $F(2, 13) = 37,52$, $p < 0,0001$, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p < 0,0001$, SAL(D2) vs Esteira ON(D2); $p < 0,0001$] (Figura 16 A2). Em relação a CA1, o efeito rebote de delta no dia 2 foi significativo apenas na comparação entre os grupos Esteira ON e SAL [SAL(D2) vs Esteira ON(D2): +17,20%; SAL(D2) vs COCA-15(D2): +12,40 ANOVA de duas vias de medidas repetidas; interação tratamento x tempo: $F(2, 13) = 13,04$, $p = 0,0008$, teste post hoc de Tukey, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p = 0,0189$, SAL(D2) vs COCA-15(D2); $p = 0,1637$]. No Dia 3, observamos efeito da Cocaína quando comparado ao grupo Salina [SAL(D3) vs COCA-15(D3): +18,43%; ANOVA de duas vias de medidas repetidas; interação tratamento x tempo: $F(2, 13) = 13,04$, $p = 0,0008$, teste post hoc de Tukey, SAL(D3) vs COCA-15(D3); $p = 0,0402$] (Figura 16 B2). Apesar dos grupos Cocaína e Esteira aparentarem ter um aumento de coerência espectral e coerência de fase no Dia 2, com um nível mais elevado persistente no Dia 3 para o grupo Esteira ON tanto no mPFC quanto em CA1 (Figura 16 C1 e D1), as diferenças encontradas após a normalização dos valores não foram estatisticamente significantes (Figura 16 C2 e D2). A coerência de fase de delta aparenta apresentar diferença quando comparado tratamento, entretanto teste post hoc de Tukey não aponta diferença estatisticamente relevante [Anova de duas vias de medidas repetidas; tratamento: 16,96%; $F(2, 13) = 3,898$, $p = 0,0472$] (Figura 16 D2).

Figura 16: Alterações de potência, coerência espectral e coerência de fase de delta em animais Cocaína 15 mg/kg e Esteira ON comparados a animais salina em fase NREM; (A1 e A2): PSDs de mPFC dos diferentes grupos nos três dias de registro; Esteira ON parece demonstrar uma maior potência em delta e theta no Dia 2 quando comparado ao dia 1, mas ao comparar as potências normalizadas entre grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes; (B1 e B2): PSDs de CA1 dos diferentes grupos nos três dias de registro; ao primeiro olhar, o grupo cocaína aparenta ter uma maior contribuição de delta no Dia 3 quando comparado a seu Dia 1, e o grupo Esteira ON parece ter uma maior contribuição de delta e theta no Dia 2, mas novamente ao comparar os diferentes grupos entre si não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes; (C1 e C2) coerência espectral de delta nos diferentes grupos experimentais; os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa de coerência espectral quando comparados ao grupo controle salina; (D1 e D2): coerência de fase em delta nos diferentes grupos experimentais normalizados pelo primeiro dia de registro; os animais dos grupos experimentais cocaína e esteira ON apresentaram uma elevação absoluta na coerência de fase em delta, mas a diferença não foi estatisticamente significativa.



Fonte: Autor

5.6 Efeito da Cocaína e protocolo de privação de sono por esteira sobre o sono REM subsequente.

Como previamente descrito, ao analisar os efeitos da privação de sono induzida por esteira comparativamente aos efeitos de cocaína, foi observada uma queda significativa no tempo despendido em estado REM durante o período da manhã, assim como uma diminuição na duração de bouts de REM no período da tarde em animais Esteira ON quando comparados com animais Cocaína 15 mg/kg (Figura 11 C e D). Com estes dados em mente e apesar de não termos encontrado uma diferença para a latência do primeiro episódio de REM no sono subsequente ao tratamento no Dia 2 (Figura 11 B), selecionamos as últimas 4 horas de registro do Dia 2 para analisar possíveis efeitos na potência, coerência espectral e coerência de fase de theta. A Figura 17 contém 5 janelas de 10 segundos contíguas representando um animal Esteira ON (R5) durante REM. A predominância de componentes de frequência de 5 a 12 Hz (theta), que juntamente à ausência de atividade no EMG são característicos de REM. Ao comparar as PSDs dos diferentes grupos, não é possível observar diferenças na contribuição de theta para a potência do sinal em nenhum dos três dias de registro, tanto no mPFC quanto em CA1 (Figura 18 A1 e B1). Similarmente, ao comprar as potências de theta normalizadas pelo Dia 1 entre os diferentes grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no mPFC e em CA1 [mPFC: Anova de duas vias de medidas repetidas; tratamento: 25,66%; $F(2, 13) = 3,480$, $p = 0,0616$] [CA1: Anova de duas vias de medidas repetidas; tratamento: 9,775%; $F(2, 13) = 1,117$, $p = 0,3566$] (Figura 18 A2 e B2), assim como não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na potência de theta nas duas regiões entre grupos (Figuras 18 A3 e B3). Ao comparar a coerência espectral e de fase dos diferentes componentes de sinal nos grupos experimentais, não foram observadas diferenças na coerência espectral para nenhum dos grupos tratamento em relação ao grupo salina, assim como não são observadas diferenças de coerência de fase (Figura 18 C1 e D1) as Ao normalizar os valores de coerência espectral dos grupos pelo primeiro dia de registro baseline, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes [Anova de duas vias de medidas repetidas; tratamento: 10,09%; $F(2, 13) = 1,034$, $p = 0,3829$] (Figura 18 C2), assim como não foram encontradas diferenças significativas de coerência de fase em theta para animais Cocaína e Esteira ON [Anova de duas vias de medidas repetidas; tratamento: 13,00%; $F(2, 13) = 1,480$, $p = 0,2636$] (Figura 18 D2).

Figura 17: Estado cerebral representativo de épocas REM no mPFC e em CA1 no segundo dia de registro; os traçados de mPFC, CA1 e EMG representam a amplitude dos respectivos LFPs enquanto que os mapas de calor indicam a potência em diferentes frequências das componentes de sinal. Note uma predominância de componentes de frequência de 5 a 12 Hz (theta) apenas em CA1, que juntamente à ausência de atividade no EMG é característico de sono REM.

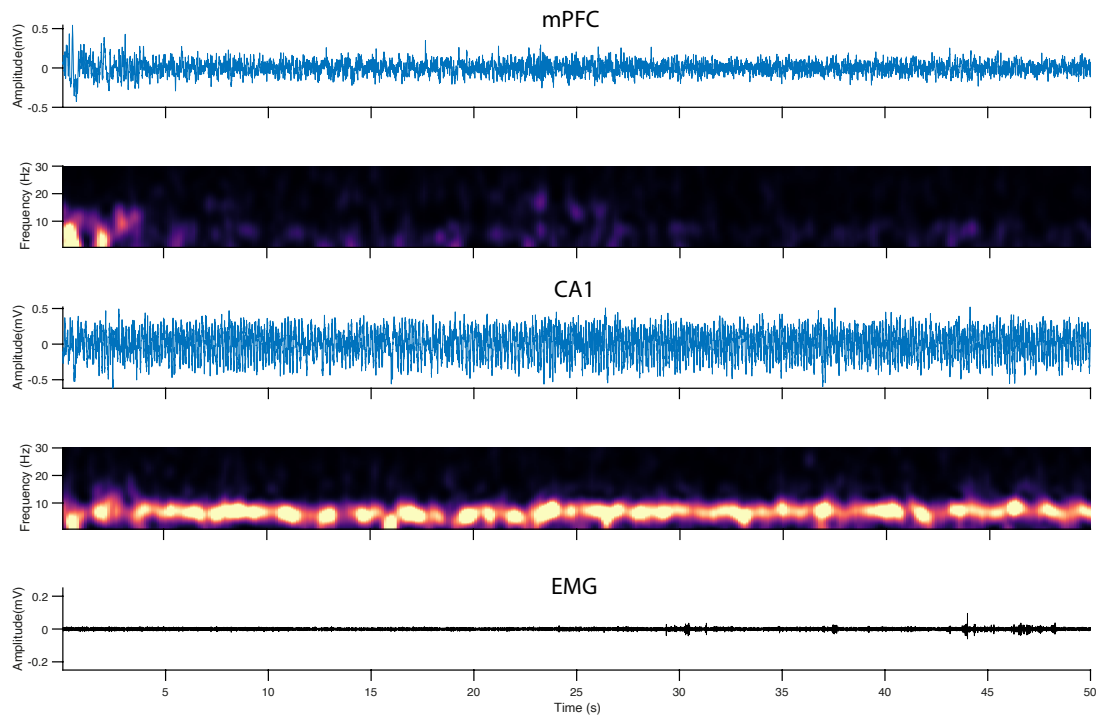
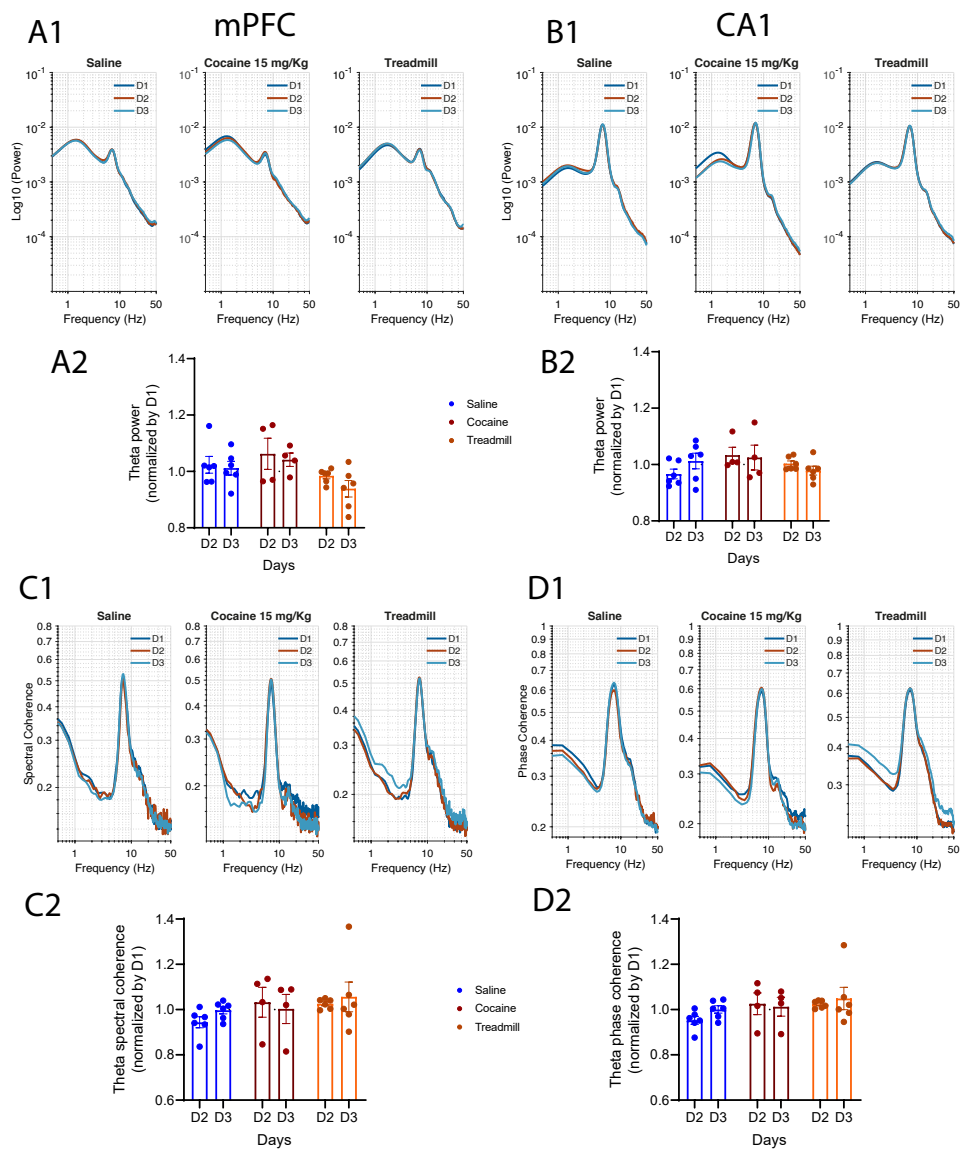


Figura 18: Alterações de potência, coerência espectral e coerência de fase de theta em animais Cocaína 15 mg/kg e Esteira ON comparados a animais salina em fase REM; (A1 e A2): PSDs de mPFC dos diferentes grupos nos três dias de registro; as PSDs e comparações entre grupos não demonstraram diferenças significativas na potência de theta no mPFC entre os diferentes grupos(B1 e B2):. PSDs de CA1 dos diferentes grupos nos três dias de registro; similarmente, as PSDs e comparações entre grupos não demonstraram diferenças significativas na potência de theta em CA1 nos diferentes grupos; (C1 e C2) coerência espectral de delta nos diferentes grupos experimentais; os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa de coerência espectral quando comparados ao grupo controle salina; (D1 e D2): coerência de fase em delta nos diferentes grupos experimentais normalizados pelo primeiro dia de registro; os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa de coerência de fase quando comparados ao grupo controle salina.



Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

Assim como foi descrito previamente, drogas estimulantes como a cocaína possuem grande potencial de dependência, com os mecanismos subjacentes a esta condição ainda pouco compreendidos. Berro et al. (2014) demonstraram que o tratamento com cocaína leva a um aumento de impulsividade em roedores, o que parece estar associado a uma maior propensão ao desenvolvimento de procura compulsiva por cocaína em modelos de auto administração. Os autores também demonstraram que a privação de sono tem um efeito potencializador sobre a hiperlocomoção induzida por cocaína em roedores; ainda, a privação de sono aparenta levar o aumento da densidade de receptores D1 e D2 no sistema mesocorticolímbico, assim como um aumento de atividade de neurônios dopaminérgicos (Berro et al., 2014). A sinalização dopaminérgica através da via mesolímbica tem papel importante para a modulação do ciclo sono-vigília, com um aumento de sinalização dopaminérgica em VTA e NAc sendo capaz de promover e manter o estado de vigília (Oishi e Lazarus 2017). Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi investigar se a privação induzida por esteira, sem intervenção farmacológica prévia ou subsequente, seria capaz de afetar padrões oscilatórios e acoplamento em redes hipocampo-fronto-corticais, arquitetura do sono e memória em ratos de maneira similar à cocaína. Demonstramos assim que, similarmente à cocaína, a privação induzida por esteira é capaz de produzir um estado persistente de alerta, caracterizado por aumento na latência para início do sono e, conseqüentemente, diminuição do tempo despendido em sono NREM e REM e aumento na duração dos bouts do estado de vigília durante os períodos da tarde. Ainda, durante o estado acordado, observamos um aumento sustentado da coerência entre CA1 e mPFC na banda de frequência theta tanto no grupo privado de sono por esteira quanto no grupo tratado com cocaína comparados ao grupo controle salina. Também observamos um aumento significativo da potência em delta em CA1 e no mPFC durante o sono NREM posterior ao efeito de alerta inicial induzido por ambos os tratamentos, em comparação ao grupo controle salina. Curiosamente, apesar de suas semelhanças, a privação de sono induzida por esteira foi capaz de causar um prejuízo em tarefa de reconhecimento de objeto não observado por nós em animais tratados com cocaína. Análises adicionais são necessárias para elucidar os mecanismos através dos quais essas diferenças se manifestam em termos comportamentais. Em relação ao aumento significativo da latência para início do sono induzido por cocaína, nossos achados são consistentes com a literatura. Bjorness e Greene (2018) demonstraram diferenças dose-dependentes sobre a latência para o início do sono. Ainda de acordo com estudos anteriores (Hill, Mendelson, Bernstein, 1977; Bjorness e Greene, 2018),

não observamos diferenças significativas sobre a arquitetura do sono 24h depois do tratamento. Estudos anteriores demonstraram um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona durante privação de sono induzida por esteira que potencialmente poderiam influenciar nas atividades oscilatórias (Tartar et al., 2009), assim como a frequência respiratória alterada em situações de esforço físico, em particular em theta (Heck et al., 2016). Entretanto, o protocolo desenvolvido neste trabalho quando comparado à protocolos similares de privação por esteira é de duração significativamente mais curta e com velocidade menor (Tartar et al., 2009, Vollert et al., 2011, Guzman-Marin et al., 2005), o que poderia ter minimizado o impacto do exercício na atividade da rede de forma que este se tornasse negligente. Investigações mais profundas se fazem necessárias.

6.1 Reconhecimento da localização de objetos e sua relação com o acoplamento em theta

Ao avaliarmos a possível relevância funcional dos nossos achados eletrofisiológicos utilizando a tarefa de localização de objetos, nossos resultados mostraram que diferentemente da privação induzida por esteira, dose aguda de cocaína 15 mg/kg não foi capaz de causar alterações significativas no índice de discriminação médio em relação ao grupo Salina. Essa ausência de efeitos da parece estar de acordo com o trabalho de Jentsch 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. Entretanto, ela contrasta com outros estudos onde dose única de cocaína e tratamento com anfetamina foram capazes de modular memória prospectiva e de trabalho (Hutten et al., 2018; Garret et al., 2015). Como descrito anteriormente, através de estudo de aprendizagem em labirinto em Y com ratos, Benchanane et al. (2010) avaliaram a coerência em theta entre CA1 e mPFC em e observaram um pico de coerência em theta entre as duas regiões durante o momento de tomada de decisão imediatamente antes da bifurcação dos braços, um achado que foi reproduzido com sucesso em animais anestesiados por meio de infusão intra-cerebral de dopamina, implicando assim que a sinalização dopaminérgica teria nesse aumento de coerência. Ainda, em termos comportamentais, estes efeitos poderiam ser interpretados através de uma possível expectativa de recompensa (Schultz et al., 1997). Desta maneira, hipotetizamos que o aumento da neurotransmissão dopaminérgica induzido por cocaína seja capaz de ativar mecanismos responsáveis por compensar os prejuízos de memória tipicamente induzidos por privação de sono, os quais não puderam ser elucidados diretamente através das

análises implementadas no vigente trabalho, de maneira que uma investigação mais profunda se faz necessária.

6.2 Efeito rebote de ondas delta

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. Resultados similares foram obtidos em estudo anterior de nosso grupo (Gusmão et al., 2020). Tonomi e Cirelli (2014) propõem a hipótese do ajuste homeostático, no qual o fortalecimento generalizado de conexões sinápticas decorridos durante o período acordado é revertido de maneira seletiva durante o sono. Uma vez que a retenção de informação e aprendizado ocorrem principalmente através do processo de fortalecimento sináptico, esta renormalização de atividade neural seletiva seria essencial para evitar a saturação do sistema e permitir a aquisição de novas informações (Tononi e Cirelli, 2018). Durante o sono NREM, a atividade neuronal espontânea leva a reativação de determinadas conexões estabelecidas e fortalecidas durante o período acordado (Tononi e Cirelli, 2018). Desta maneira, é descrito um mecanismo que ilustra o papel e importância do sono para o processo de aquisição e consolidação de memórias, no qual conexões que são reativadas de forma mais consistente e mais fortemente são favorecidas e conexões sinápticas de menor atividade são enfraquecidas (Tononi e Cirelli, 2018). Ainda, os autores descrevem que esse processo é marcado por oscilações delta de alta amplitude, que decaem ao longo do período de sono. Concomitantemente, Berro et al. (2014) cita que sob condições de privação de sono, animais apresentam um aumento da densidade de receptores D1 e D2 no sistema dopaminérgico mesolímbico, assim como um aumento de liberação de dopamina e disparo de neurônios dopaminérgicos. Interessantemente, Krone et al. (2021) ao estudar o papel do córtex na regulação do ciclo sono-vigília, demonstraram que o silenciamento de neurônios do giro denteado arquicortical leva a um aumento do tempo despendido acordado e uma redução do efeito rebote no sono NREM após privação do sono, juntamente com a atenuação da potência de theta durante a privação; ainda, o efeito rebote no sono NREM após a privação parece ser específicos à áreas corticais, mas não a camadas (Krone et al., 2021). Considerando que o efeito rebote em oscilações delta evidenciado em animais tratados com cocaína pode ser relevante para o processo de formação de memórias de associação entre droga e contexto proposto por nós anteriormente, nós investigamos se este efeito poderia ser reproduzido unicamente através de privação de sono, sem intervenção farmacológica. O presente trabalho demonstrou que após

o período de alerta induzido pela privação de sono induzida por esteira e portanto um aumento para a latência do sono, há um aumento na potência de delta no mPFC e CA1 no sono subsequente ao tratamento, com um retorno gradativo ao estado basal no dia seguinte ao período de teste. Corroborando esse achado, uma diminuição de sono de ondas lentas seguido de efeito rebote também foi demonstrado de forma dose-dependente por Bjorness e Greene (2018). Desta maneira, demonstramos uma alta similaridade entre efeitos eletrofisiológicos induzidos por privação de sono em esteira e os efeitos induzidos por tratamento agudo com cocaína, semelhanças que poderiam ser potencialmente explicadas pelo recrutamento de substratos comuns (Berro et al., 2014).

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

É importante ressaltar que o atual estudo possui limitações inerentes, dentre elas um baixo N de animais por grupo utilizados durante a tarefa comportamental ($n = 5$), e a necessidade de verificar se a maioria dos animais controles estão, de fato, discriminando os objetos durante a tarefa comportamental, refinando assim o protocolo de reconhecimento de objetos utilizado em nosso laboratório. A histologia para verificação da posição dos eletrodos dos grupos Cocaína e Salina foram realizadas por Gusmão et al.; a histologia do grupo esteira está em andamento.

8 CONCLUSÃO E PRÓXIMOS PASSOS

Neste estudo, demonstramos que a privação de sono induzida por esteira é capaz de afetar padrões oscilatórios e coordenação entre CA1 e mPFC de maneira similar àquela induzida por dose aguda de cocaína tanto durante estado acordado quanto no sono subsequente. Entretanto, o tratamento agudo com cocaína, aparentemente, parece ativar mecanismos adicionais capazes de atenuar os prejuízos de memória induzidos por privação de sono. Para entender melhor este fenômeno, nossos próximos passos serão: (1) aumentar o número de sujeitos por grupo e (2) avaliar marcadores eletrofisiológicos de processamento de memória durante o sono, tais como ripples hipocâmpais e spindles tálamo-corticais.

REFERÊNCIAS

ANGARITA, G. A., CANAVAN, S. V., FORSELIUS, E., BESSETTE, A., PITTMAN, B., MORGAN, P. T. Abstinence-related changes in sleep during treatment for cocaine dependence. *Drug and Alcohol Dependence*. 134; 343– 347 (2014).

ANGARITA, G. A., EMADI, N., HODGES, S., MORGAN, P. T. Sleep abnormalities associated with alcohol, cannabis, cocaine, and opiate use: a comprehensive review. *Addict Sci Clin Pract*. 11:9 (2016).

AHN, S., LINSENBARDT, D. N., LAPISH, C. C. & RUBCHINSKY, L. L. Repeated injections of D-Amphetamine evoke rapid and dynamic changes in phase synchrony between the prefrontal cortex and hippocampus. *Front. Behav. Neurosci*. 7, 1–10 (2013).

BAHLS F. C., BAHLS S.C. *Cocaína: origens, passado e presente*. 6(2), p. 177–181 (2002).

BASTOS, F., VASCONCELLOS, M., BONI, R., REIS, N., COUTINHO, C. III *Fiocruz* p. 96–98 (2017). Levantamento nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira.

BENCHENANE, K., PEYRACHE, A., KHAMASSI, M., TIEMEY, P. L., GIOANNI, Y., BATTAGLIA, F. P., WIENER, S. I. Coherent Theta Oscillations and Reorganization of Spike Timing in the Hippocampal-Prefrontal Network upon Learning. *Neuron*. 66; 921–936 (2010).

BERKE, J. D. Fast oscillations in cortical-striatal networks switch frequency following rewarding events and stimulant drugs. *European Journal of Neuroscience*. 30; 848–859 (2009).

BERRO, L. F., SANTOS, R., HOLLAIS, A. W., WUO-SILVA, R., FUKUSHIRO, D. F., MÁRI-KAWAMOTO, E., COSTA, J. M., TROMBIM, T. F., PATTI, C. L., GRAPIGLIA, S. B., TUFIK, S., ANDERSEN, M. L., FRUSSA-FILHO, R. Acute total sleep deprivation potentiates cocaine-induced hyperlocomotion in mice.

BIMPISIDIS, Z. & WALLÉN-MACKENZIE, Å. Neurocircuitry of Reward and Addiction: Potential Impact of Dopamine–Glutamate Co-release as Future Target in Substance Use Disorder. *J. Clin. Med.* 8, 1887 (2019).

BJORNESS, T.E., GREENE, R.W. Sleep deprivation alters the time course but not magnitude of locomotor sensitization to cocaine. *Scientific Reports.* 8:17672 (2018).

BJORNESS, Theresa E.; GREENE, Robert W. Dose response of acute cocaine on sleep/waking behavior in mice. **Neurobiology of sleep and circadian rhythms**, v. 5, p. 84-93, 2018.

BOYCE, R., GLASGOW, S. D., WILLIAMS, S., ADAMANTIDIS, A. Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science.* Vol. 352; 6287 (2016).

BUZSÁKI, G. & DRAGUHN, A. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science.* 304; 1926–1929 (2004).

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

CENTONZE, D., GRANDE, C., USIELLO, A., GUBELLINI, P., ERBS, E., MARTIN, A. B., PISANI, A., TOGNAZZI, N., BERNARDI, G., MORATALLA, R., BORRELLI, E., CALABRESI, P. Receptor Subtypes Involved in the Presynaptic and Postsynaptic Actions of Dopamine on Striatal Interneurons. *The Journal of Neuroscience.* 23, (15): 6245– 6254 (2013).

CHEN, B., WANG, X., LIU, X., LIU, Z., DONG, Y., HUANG, Y. H. Sleep Regulates Incubation of Cocaine Craving. *The Journal of Neuroscience.* 35(39): 13300 –13310 (2015).

CHEN, Z. & WILSON, M. A. Deciphering Neural Codes of Memory during sleep. *Trends in Neurosciences.* Vol. 40. No. 5 (2017).

COLE, S. R. & VOYTEK, B. Brain Oscillations and the Importance of Waveform Shape. *Trends Cogn. Sci.* 21, 137–149 (2017).

CORTES, J. A. et al. Altered activity-based sleep measures in rhesus monkeys following cocaine self-administration and abstinence. *Drug Alcohol Depend.* 163, 202–208 (2016).

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).

DE VRIES, T. J., SCHOFFELMEER, A. N. M., BINNEKADE, R., MULDER, A. H., VANDERSCHUREN L. J. M. J. Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *European Journal of Neuroscience.* 10; 3565–3571 (1998).

DZIRASA, K., SANTOS, L. M., RIBEIRO, S., STAPLETON, J., GAINETDINOV, R. R., CARON, M. G., & NICOLELIS, M. A. L. Persistent Hyperdopaminergia Decreases the Peak Frequency of Hippocampal Theta Oscillations during Quiet Waking and REM Sleep. *PLoS ONE.* 4(4), e5238 (2009).

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

EVERITT, B.K., DICKINSON, A., ROBBINS, T.W. The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Research Reviews*, 36 p. 129–138. (2001).

FERNANDEZ, A., TRIGO, J. M., GUTIERREZ, M. G., ORTEGA, A., TERNIANOV, A. A., NAVARRO, D., ROBLEDO, P., BERBEL, P., MALDONADO, R., MANZANARES, J. Decreased Cocaine Motor Sensitization and Self-Administration in Mice Overexpressing Cannabinoid CB2 Receptors. *Neuropsychopharmacology.* 37, 1749–1763 (2012).

FILIP, M., BUBAR, M.J., CUNNINGHAM, K. A. Contribution of serotonin (5-Hydroxytryptamine; 5-HT) 5-HT₂ Receptor Subtypes to the Hyperlocomotor Effects of Cocaine: Acute and Chronic Pharmacological Analyses. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* v. 310 p. 1246–1254 (2004).

FILIP, M., FRANKOWSKA, M., GOLDA, A., ZANIEWSKA, M., VETULANI, J., PRZEGALINSKI, E. Various GABA-mimetic drugs differently affect cocaine-evoked hyperlocomotion and sensitization. *European Journal of Pharmacology*. 541; 163–170 (2006).

FLORESCO, S., MAGYAR, O., GHODS-SHARIFI, S. VEXELMAN, C., TSE, M. T. Multiple Dopamine Receptor Subtypes in the Medial Prefrontal Cortex of the Rat Regulate Set-Shifting. *Neuropsychopharmacol* 31, 297–309 (2006).

FRANZEN, J. D. & WILSON, T. W. Amphetamines modulate prefrontal γ oscillations during attention processing. *Neuroreport* 23, 731–735 (2012).

GARRETT, Douglas D. et al. Amphetamine modulates brain signal variability and working memory in younger and older adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 24, p. 7593-7598, 2015.

GRAVES, L., PACK, A. & ABEL, T. Sleep and memory: a molecular perspective. *Trends in Neuroscience*. 24(4), 237–243 (2001).

GUSMÃO, A. P. S. **Estudo dos efeitos da exposição única à cocaína sobre o acoplamento oscilatório em circuitos hipocampo-corticais, arquitetura do sono e memória em ratos.** Tese (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2020

GUZMAN-MARIN, Ruben et al. Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 2111-2116, 2005.

HAYES, Monson H. *Statistical digital signal processing and modeling*. John Wiley & Sons, 2009.

HECK, Detlef H. et al. Cortical rhythms are modulated by respiration. *BioRxiv*, p. 049007, 2016.

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

HORGER, B. A., IYASERE, C. A., BERHOW, M. T., MESSER, C. J., NESTLER, E. J., TAYLOR, J. R. Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 19, 4110–4122 (1999).

HUTTEN, Nadia RPW et al. A single dose of cocaine enhances prospective memory performance. *Journal of Psychopharmacology*, v. 32, n. 8, p. 883-892, 2018.

JENTSCH JD, PH D, OLAUSSON P, PH D, GARZA RD LA, PH D, ET AL. Impairments of Reversal Learning and Response Perseveration after Repeated, Intermittent Cocaine Administrations to Monkeys. 2002;(01).

KALIVAS, P. W., PIERCE, R. C., CORNISH, J., SORG, B. A. A role for sensitization in craving and relapse in cocaine addiction. *Journal of Psychopharmacology.* 12(1); 49–53 (1998).

KALIVAS, P.W., VANDEDRSCHUREN, L.J. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 151 (2-3) p. 99–120 (2000).

KRONE, Lukas B. et al. A role for the cortex in sleep–wake regulation. *Nature neuroscience*, v. 24, n. 9, p. 1210-1215, 2021.

KNAPP, C. M., DATTA, S., CIRAULO, D. A. & KORNETSKY, C. Effects of low dose cocaine on REM sleep in the freely moving rat. *Sleep Biol. Rhythms* 5, 55–62 (2007).

LAPISH, C. C., CHIANG, J., WANG, J. Z. & PHILLIPS, A. G. Oscillatory power and synchrony in the rat forebrain are altered by a sensitizing regime of d-amphetamine. *Neuroscience* 203, 108–121 (2012).

LEITE, M. C., Andrade A.G. Cocaína e crack: dos fundamentos ao tratamento. *Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda*, p. 15–23 (1999).

LICATA, A., TAYLOR, S., BERMAN, M. & CRANSTON, J. Effects of cocaine on human aggression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 549–552 (1993).

LI, Y., XIE, X., XING, H., YUAN, X., WANG, Y., JIN, Y., WANG, J., VREUGDENHIL, M., ZHAO, Y., ZHANG, R., LU, C. The Modulation of Gamma Oscillations by Methamphetamine in Rat Hippocampal Slices. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13; 277 (2019).

MAINGRET, N., GIRARDEAU, G., TODOROVA, R., GOUTIERRE, M., ZUGARO, M. Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nature Neuroscience*. Vol. 19, No. 7 (2016).

MIYAWAKI, H., WATSON, B. O., & DIBA, K. Neuronal firing rates diverge during REM and homogenize during non-REM. *Scientific REports*. 9:689 (2019).

MOELLER, S. J., MALONEY, T., PARVAZ, M. A., ALIA-KLEIN, N., WOICIK, P. A., TELANG, F., WANG, G., VOLKOW, N. D., GOLDSTEIN, R. Z. Impaired insight in cocaine addiction: laboratory evidence and effects on cocaine-seeking behaviour. *Brain*. 133; 1484–1493 (2010).

MONTI, Jaime M.; MONTI, Daniel. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking. *Sleep medicine reviews*, v. 11, n. 2, p. 113-133, 2007.

NISHI, A., KUROIWA, M., & SHUTO, T. Mechanisms for the Modulation of Dopamine D1 Receptor Signaling in Striatal Neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5 (2011).

OISHI, Yo; LAZARUS, Michael. The control of sleep and wakefulness by mesolimbic dopamine systems. *Neuroscience research*, v. 118, p. 66-73, 2017.

ÖZKAN, M., JOHNSON, N. W., SEHIRLI, U. S., WOODHALL, G. L. & STANFORD, I. M. Dopamine acting at D1-like, D2-like and α 1-adrenergic receptors differentially modulates theta and gamma oscillatory activity in primary motor cortex. *PLoS One* 12, 1–15 (2017).

PACE-SCHOTT, Edward F. & HOBSON, J. Allan. The Neurobiology of Sleep: Genetics, Cellular Physiology and Subcortical Networks. *Nature Reviews. Neuroscience*. Vol. 3 (2002).

PACE-SCHOTT, E. F., STICKGOLD, R., MUZUR, A., WIGREN, P. E., WARD, A. S., HART, C. L., CLARKE, D., MORGAN, A., HOBSON, J. A., Sleep quality deteriorates over a binge–abstinence cycle in chronic smoked cocaine users. *Psychopharmacology*. 179: 873–883 (2005).

PAIVA, L. F. As dinâmicas do mercado ilegal de cocaína na tríplice fronteira entre Brasil, Peru e Colômbia. *Revista brasileira de ciências sociais* 34 (99) (2018).

PINS, B., MONTALBAN, E., VANHOUTTE, P., GIRALT, A., GIRAULT, J. A. The non-receptor tyrosine kinase Pyk2 modulates acute locomotor effects of cocaine in D1 receptor expressing neurons of the nucleus accumbens. *Scientific Reports*. 10:6619 (2020).

PEPE, Margaret Sullivan. **The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction.** *Oxford University Press*, USA, 2003.

PERREAULT, M., HASBI, A., O'DOWD, B. & GEORGE, S. R. Heteromeric Dopamine Receptor Signaling Complexes: Emerging Neurobiology and Disease Relevance. *Neuropsychopharmacol.* 39, 156–168 (2014).

PRIETO, J., Molecular changes in the nucleus accumbens and prefrontal cortex associated with the locomotor sensitization induced by coca paste seized samples. *Psychopharmacology* 237, pp.1481–1491 (2020).

RASCH AND BORN, “About Sleep’s Role in Memory” 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; 16:716–722.

RODRIGUEZ-ESPINOSA, N. & FERNANDEZ-ESPEJO, E. Effects of acute and repeated cocaine on markers for neural plasticity within the mesolimbic system in rats. *Psychopharmacology*. 232(1), 57–62 (2014).

RUSSO, S. J. & NESTLER, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*. Vol. 14 (2013).

SAWANGJIT, Anuck et al. The hippocampus is crucial for forming non-hippocampal long-term memory during sleep. *Nature*, v. 564, n. 7734, p. 109-113, 2018.

SCHULTZ, W., DAYAN, P. & MONTAGUE, R. A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science*. Vol. 275, 5306; 1593–1599 (1997).

SHI, W., PUN, C. & ZHOU, Y. Psychostimulants Induce Low-Frequency Oscillations in the Firing Activity of Dopamine Neurons. *Neuropsychopharmacology*. 29; 2160–2167 (2004).

SIAPAS, ATHANASSIOS G.; WILSON, MATTHEW A. Coordinated Interactions Between Hippocampal Ripples and Cortical Spindles During Slow-Wave Sleep. *Neuron*. 1998; 21:1123–1128.

SIROTA, ANTON; CSICSVARI, JOZSEF; BUHL, DEREK; BUZSÁKI, GYÖRGY. Communication Between Neocortex and Hippocampus During Sleep in Rodents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100:2065–2069

SJULSON, L., PEYRACHE, A., CUMPELIK, A., CASSATARO, D., BUZSÁKI, G. Cocaine Place Conditioning Strengthens Location-Specific Hippocampal Coupling to the Nucleus Accumbens. *Neuron*. 98(5), 926–934 (2018).

SPEALMAN, Roger. Antagonism of behavioral effects of cocaine by selective dopamine receptor blockers. *Psychopharmacology*. 10:142–145 (1990).

SULLIVAN D, MIZUSEKI K, SORGI A, BUZSÁKI G. Comparison of sleep spindles and theta oscillations in the hippocampus. *J Neurosci*. 2014;34(2):662–74.

SKELIN, Ivan; KILIANSKI, Scott; MCNAUGHTON, Bruce L. Hippocampal coupling with cortical and subcortical structures in the context of memory consolidation. *Neurobiology of learning and memory*, v. 160, p. 21-31, 2019.

TARTAR, Jaime L. et al. Experimental sleep fragmentation and sleep deprivation in rats increases exploration in an open field test of anxiety while increasing plasma corticosterone levels. *Behavioural brain research*, v. 197, n. 2, p. 450-453, 2009.

THOMAS, M. J., KALIVAS P. W, SHAHAM Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *British Journal of Pharmacology* 154, 327–342 (2008).

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;49(18):1841–50.

TORT ABL, KOMOROWSKI RW, MANNS JR, KOPELL NJ, EICHENBAUM H. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(49):20942–7.

TIERNEY, P. L., THIERRY, A. M., GLOWINSKI, J., DENIAU, J. M., GIOANNI, Y., Dopamine Modulates Temporal Dynamics of Feedforward Inhibition in Rat Prefrontal Cortex In Vivo. *Cerebral Cortex*. Vol. 18. 10; 251–2262 (2008).

VOLLERT, Craig et al. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behavioural brain research*, v. 224, n. 2, p. 233-240, 2011.

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

WELCH, P.D , The use of fast Fourier transforms for the estimation of power spectra: A method based on time averaging over short modified periodograms, *IEEE Transactions on Audio and Electroacoustics*, vol. 15, pp. 70-73, 1967

WHEELER, R. A., TWINING, R. C., JONES, J. L., SLATER, J. M., GRIGSON, P. S., CARELLI, R. M. Behavioral and Electrophysiological Indices of Negative Affect Predict Cocaine Self-Administration. *Neuron* 57. 774–785 (2008).

Who.int. 2020. WHO | Cocaine. [online] Available at: <https://www.who.int/substance_abuse/facts/cocaine/en/> [Accessed 6 May 2020].

WOOLVERTON, W. L. & JOHNSON, K. M. Neurobiology of cocaine abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 193–200 (1992).

YANG, Shu-Long et al. Increased non-rapid eye movement sleep by cocaine withdrawal: possible involvement of A2A receptors. *Archives of pharmacal research*, v. 34, n. 2, p. 281-287, 2011.

Drugabuse.gov. 2020. NIDA | What are the short-term effects of cocaine use? [online] Available at:.....<<https://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/cocaine/what-are-short-term-effects-cocaine-use>> [Accessed 5 July 2020].

ZHU, B., CHEN, C., SHAO, X., LIU, W., YE, Z., ZHUANG, L., ZHENG, L., LOFTUS, E. F., XUE, G. Multiple interactive memory representations underlie the induction of false memory. *PNAS*. 116(9); 3466–3475 (2019).