



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Paulo Cesar da Costa Araujo

Efeito da privação de sono paradoxal na expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo e no aprendizado e memória

Rio de Janeiro

2012

Paulo Cesar da Costa Araujo

Efeito da privação de sono paradoxal na expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo e no aprendizado e memória



Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A663 Araujo, Paulo César da Costa.
Efeito da privação de sono paradoxal na expressão de receptores para glicocorticosteróides no hipocampo e no aprendizado e memória / Paulo César da Costa Araujo. – 2012.
55 f.

Orientador: Olga Maria Martins da Silva de Almeida.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Privação do sono – Complicações. 2. Receptores de Glucocorticóides - Fisiologia. 3. Hipocampo 4. Distúrbios cognitivos – Teses. 5. Distúrbios da memória. I. Almeida, Olga Maria Martins da Silva. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.8-009.836

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Paulo Cesar da Costa Araujo

Efeito da privação de sono paradoxal na expressão de receptores para glicocorticóides no hipocampo e no aprendizado e memória

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2012.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Frank Tenório de Almeida Costa

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Mônica Santos Rocha

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe e minha irmã por terem me ensinado e me transformarem na pessoa que sou hoje.

Ao Beto e a Fátima por terem me ajudado e apoiado sempre.

A Prof^a, Olga por ser sempre atenciosa e por ser sempre compreensiva.

Ao Prof. Frank, a Prof^a. Penha e ao Prof. Marcos por estarem sempre atentos as dúvidas, por ouvirem minhas besteiras e por darem puxões de orelha quando necessário.

A Skinner, minha gordinha favorita, por ser uma grande amiga, atender meus telefonemas às 9 da manhã aos domingos e por estar sempre disposta a me ajudar.

A Bela por ser sempre tão prestativa, carinhosa e bem humorada.

A Bruninha pelo carinho, por estar sempre presente e pelos conselhos.

Ao LO pela diversão e cantoria de todos os dias no laboratório.

A Martinha pelo carinho, pelas conversas, conselhos, ajudas e desabafos.

Aos outros amigos do Lab (Guedes, Michael, Gabizinha, Aline e todos os outros) pela diversão e bagunça.

A meus amigos Podão, Latino e Leo pelo bar de quase toda sexta-feira e pela companhia.

Não sabemos nem um milionésimo de nada

Thomas Edison

RESUMO

ARAUJO, Paulo Cesar da Costa. *Efeito da privação de sono paradoxal na expressão de receptores para glicocorticoides no hipocampo e no aprendizado e memória*. 2012. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Vários trabalhos têm demonstrado uma relação entre sono e memória. Desta forma, tem sido descrito um papel importante do sono na consolidação da memória e um efeito negativo pela privação do mesmo. O hipocampo é uma região importante para a formação e consolidação da memória espacial, e contém uma alta expressão de receptores para corticosteróides. As ações dos corticosteróides no hipocampo são fundamentais para a aquisição de memória e dependem de um balanço adequado entre receptores de Glicocorticóides (RGc) e Mineralocorticóides (RMn). Assim é descrito na literatura que um aumento na expressão de RMn é promotor de aquisição de memória, enquanto que um aumento na expressão de RGc produz um efeito negativo. Apesar dos níveis circulantes de glicocorticóides na privação de sono paradoxal (PSP), não serem responsáveis pelo enfraquecimento de memória, não existem dados sobre a expressão dos receptores para corticosteróides no hipocampo, após PSP. Neste trabalho tivemos como objetivo investigar a expressão de receptores de Glicocorticóides no hipocampo, bem como avaliar aprendizado e memória em ratos privados de sono paradoxal. Ratos Wistar machos (250- 350g) foram submetidos à PSP, utilizando-se o método de múltiplas plataformas por um período de 96 horas. Após 96h de privação os animais foram anestesiados e perfundidos. Secções de 25 µm na área do hipocampo foram obtidas e reagidas com anticorpos para receptores de Glicocorticóides. Avaliamos as áreas CA1, CA3 e Giro Denteado. O aprendizado e memória espacial foram avaliados através do teste do labirinto aquático de oito braços, antes e após o período de privação de sono. Avaliou-se a latência de escape e o número de erros obtidos. O grupo PSP apresentou um aumento na expressão de RGc nas regiões: CA1 e Giro Denteado, não se observando diferença significativa na região CA3. A PSP prévia aos testes de aprendizado e memória não provocou alterações significativas. A privação de sono pós-aprendizado também não produziu diferenças estatisticamente significativas, mas um aumento no tempo de latência de escape e número de erros sugere um enfraquecimento na consolidação da memória. O aumento na expressão de RGc nas áreas estudadas, pode ser consequente a uma alteração no balanço entre os receptores para corticosteróides no hipocampo e ser responsável por alterações no aprendizado e memória em ratos PSP.

Palavras-chave: Sono Paradoxal. Privação de sono. Receptor de Glicocorticóide. Hipocampo. Memória.

ABSTRACT

ARAUJO, Paulo Cesar da Costa. *Effect of paradoxical sleep deprivation in Expression of glucocorticoid receptors in hippocampus and learning and memory*. 2012. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Several studies have shown a relation between sleep and memory. In this way, an important role in memory consolidation by sleep and a negative effect induced by sleep deprivation have been described. Hippocampus is a region responsible for consolidation of spatial memory and contains a high expression of corticosteroids receptors. In the hippocampus, the corticosteroids actions are crucial for memory acquisition and depend on an adequate balance between Glucocorticoid (GR) and Mineralocorticoid receptors (MR). Studies have demonstrated that an increased expression of MR promotes memory acquisition while an increased expression of GR has negatives effects. In spite of the circulating levels of glucocorticoids in paradoxical sleep deprivation (PSD) are not responsible for the PSD induced memory impairments, do not exist studies about the expression of the GR and MR in hippocampus after PSD. In this study we investigate the expression of GR in the hippocampus and evaluate learning and memory in PSD rats. Wistar male rats (250-350g) were paradoxical sleep deprived by the multiple platform method for 96 hours. After 96h of sleep deprivation, the animals were anesthetized and perfused. Slices of 25 micron of the area of the hippocampus were obtained and reacted with antibodies against GR. We evaluated the areas CA1, CA3 and dentate gyrus (GD). Learning and spatial memory were evaluated in Radial water maze before and after PSD. We evaluated the escape latency and the number of errors obtained. PSD group showed an increased expression of GR in CA1 and GD. However, in the CA3 area there was no significant difference in expression. The PSD prior to the tests of learning and memory did not provoke significant alterations. The sleep deprivation after learning also did not produce statistically significant differences, but an increase in the time of escape latency and number of errors suggests impairment in the memory consolidation. The increase in the RGc expression in the studied areas can be consequent to an alteration in the balance between corticosteroid receptors in the hippocampus and be responsible for alterations in the learning and memory in PSD rats.

Keywords: Paradoxical sleep. Sleep deprivation. Glucocorticoid receptor. Hippocampus. Memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Registros elétricos do sono nREM e sono paradoxal.....	14
Figura 2 - Arquitetura do sono.....	15
Figura 3 - Representação do mecanismo de aprendizado e memória.....	18
Figura 4 - Categorias de sistemas de memórias.....	19
Figura 5 - Fotomicrografia de secção coronal de encéfalo de rato.....	20
Figura 6 - Tanque de privação de sono paradoxal.....	29
Figura 7 - LAROB Aparato usado para avaliação da latência de escape e quantidade de erros obtidos.....	30
Figura 8 - Desenho experimental: Teste comportamental protocolo 1.....	32
Figura 9 - Desenho experimental: Teste comportamental protocolo 2.....	33
Figura 10 - Fotomicrografias representativas de secções de hipocampo imunoreagidas com anticorpos para receptores de glicocorticóides.....	35
Figura 11 - Expressão de RGc na região CA1 do hipocampo de ratos controle e PSP.....	36
Figura 12 - Expressão de RGc na região CA3 do hipocampo de ratos controle e PSP.....	36
Figura 13 - Expressão de RGc na região GD do hipocampo de ratos controle e PSP.....	37
Figura 14 - Latência de escape de animais submetidos ao teste LAROB protocolo1.....	38
Figura 15 - Número de erros de ratos submetidos ao teste LAROB protocolo 1.....	39
Figura 16 - Latência de escape de ratos submetidos ao teste LAROB protocolo 2.....	41
Figura 17 - Número de erros de ratos submetidos ao teste LAROB protocolo 2.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Latência de escape no LAROB.....	38
Tabela 2 - Número de erros no LAROB	39
Tabela 3 - Latência de escape no LAROB.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
BSA	Bovine serum albumine (Albumina de soro bovino)
CA1	Corno de Ammon 1
CA2	Corno de Ammon 2
CA3	Corno de Ammon 3
CamKII	Calmodulin Kinase (Calmodulina cinase)
CREB	cAMP-responsive element-bind (Elemento de ligação de resposta a AMPC)
EEG	Eletroencefalograma
E-LTP	early long-term potentiation (potenciação de longo prazo precoce)
EMG	Eletromiograma
EOG	Eletrooculograma
ERK	Extracelular signal-regulated kinase (cinase extracelular reguladora de sinal)
GD	Giro denteado
HPA	Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal
LAROB	Labirinto aquático radial de oito braços
LC	Locus Coeruleus
L-LTP	Late long-term potentiation (potenciação de longo prazo tardia)
LTP	Long-term potentiation (potenciação de longo prazo)
NMDA	N-metil D-aspartato
NR1	Nuclear receptor 1 (Receptor nuclear 1)
NR2A	Nuclear receptor 2A (Receptor nuclear 2A)
NR2D	Nuclear receptor 2D (Receptor nuclear 2D)
NR2S	Nuclear receptor 2S (Receptor nuclear 2S)
nREM	Não REM
PBS	Phosphate Buffer Solution (Solução de tampão fosfato)
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PSP	Privação de sono paradoxal
REM	Rapid eye movement (Movimento rápido dos olhos)
RGc	Receptor de Glicocorticóide
RMn	Receptor de Mineralocorticóide
SD	Sleep deprivation (privação de sono)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	OBJETIVO	27
2	MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1	Animais	28
2.2	Privação de sono paradoxal	28
2.3	Avaliação de aprendizado e memória espacial	29
2.3.1	<u>Teste do labirinto aquático radial de oito braços (LAROB)</u>	29
2.4	Análise imunohistoquímica	30
2.4.1	<u>Perfusão</u>	30
2.4.2	<u>Criosecção</u>	31
2.4.3	<u>Imunohistoquímica para receptor de glicocorticoide (RGc)</u>	31
2.5	Desenho experimental	32
2.6	Análise estatística	33
3	RESULTADOS	34
3.1	Efeito da PSP na expressão de RGc	34
3.2	Análise de avaliação de aprendizado e memória espacial	37
4	DISCUSSÃO	44
	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

INTRODUÇÃO

Sono

Ciclo sono-vigília

O ciclo sono-vigília é um ritmo circadiano que é sincronizado a partir de fatores exógenos e endógenos. A luz é o principal fator externo responsável pela regulação deste ciclo. Endogenamente o ciclo vigília sono é regulado por uma estrutura hipotalâmica chamada de núcleo supraquiasmático, que é considerado o relógio biológico nos mamíferos (Aschoff, 1979).

O ciclo sono-vigília está intimamente ligado a outros ciclos biológicos como, a produção e liberação de alguns hormônios e neurotransmissores como a melatonina, hormônio do crescimento, cortisol e acetilcolina (Goichot e col., 1998).

O sono é um processo complexo e biológico que é necessário diariamente para todos os seres humanos. É considerado um período comportamentalmente quiescente e pouco responsivo ao ambiente, sendo eletroencefalograficamente e fisiologicamente distinto do estado de vigília (Chen e Kushida, 2005). Seres humanos dedicam cerca de um terço de sua vida ao sono, porém o propósito desse comportamento ainda não está totalmente esclarecido (para revisão ver: Ikeda e col., 2005).

O sono foi inicialmente considerado como um tempo de inativação cerebral, que refletia o tempo necessário para se abastecer a energia despendida pelos sistemas envolvidos na percepção sensorial durante a fase de vigília (Norman e Hayward, 2005). Em 1952, Hess e colaboradores induziram o sono em gatos através de estimulação elétrica no diencéfalo, provando a natureza ativa do sono.

A descoberta da existência do sono REM ou Paradoxal por Aserinsky e Kleitman (1953), a demonstração dos ciclos periódicos de sono por Dement e Kleitman (1957), bem como o advento da polissonografia que permitiu a gravação simultânea por eletroencefalograma (EEG), eletromiograma (EMG), eletrooculograma (EOG) entre outros parâmetros fisiológicos, proporcionaram a base para os estudos relacionados ao sono.

Mecanismos neurais do sono

O sono é gerado a partir da interação de várias populações neurais e modulado por diferentes neurotransmissores e neuropeptídeos (Garcia-Garcia e Drucker-Colin, 1999). É considerado um estado comportamental complexo, apresentando características próprias como posturas estereotipadas, atividade locomotora reduzida, resposta diminuída a estímulos sensoriais e fácil reversibilidade (Hobson, 1999). Existem várias hipóteses que tentam explicar a sua importância e embora nenhuma das hipóteses consiga juntar todas as informações disponíveis sobre o sono, é importante ressaltar que o mesmo é mantido ao longo da evolução em muitas espécies e a sua privação pode levar a alterações funcionais e até à morte em algumas espécies animais (Rechatschanffen e Siegiel, 2000; Tobler, 1983; Zimmerman e col., 2008).

A regulação dos estados de sono e vigília é feita por agrupamentos de neurônios da formação reticular, estrutura cuja principal função é a ativação do córtex cerebral (Rechatschanffen e Siegiel, 2000). Fibras ascendentes da formação reticular rostral projetam-se para núcleos no tálamo e daí para o córtex, tendo como finalidade a ativação do córtex e manutenção do estado de vigília. O sistema reticular descendente promove modulação de atividade da formação reticular (Rechatschanffen e Siegiel, 2000). Existe uma multiplicidade de conexões sinápticas na formação reticular e, portanto vários grupos neuronais e diferentes neurotransmissores estão envolvidos no ciclo sono-vigília.

Fases do ciclo sono-vigília

O cérebro dos mamíferos oscila por três diferentes estados de atividade: vigília, sono não REM e sono REM ou paradoxal (Jouvet, 1962).

Durante a fase de vigília o animal apresenta uma intensa atividade motora, comportando-se de modo a responder a estímulos do meio ambiente (Jouvet e col., 1964).

O sono consiste na ocorrência cíclica de duas fases: Sono não REM (nREM) e Sono REM. Essas fases apresentam características próprias que podem ser distinguidas através de registros elétricos, via EMG, que é o registro da atividade da musculatura esquelética; via EOG, que é o registro da atividade da musculatura ocular; e via EEG, que é o registro da atividade de neurônios corticais (Rechatschanffen e Siegiel, 2000). O sono acontece de forma

circadiana e em humanos ocorre normalmente durante a noite e em alguns casos de dia (Born e Wagner, 2009).

Sono não-REM

Durante essa fase há uma redução da atividade elétrica cortical e a taxa metabólica e a temperatura corporal apresentam seus valores mais baixos. Há uma diminuição da atividade simpática, com redução na pressão sanguínea e nos batimentos cardíacos (Jouvet e col., 1964). Quando analisado o registro elétrico da musculatura nota-se que há uma redução do tônus muscular (Rechatschanffen e Siegiel, 2000) e o registro da musculatura ocular mostra uma ausência de movimentos (Fig.1) (Jouvet e col., 1964).

Essa fase do sono é dividida em quatro estágios que apresentam características eletroencefalográficas distintas e à medida que os estágios se sucedem, o sono se torna mais profundo (Rechatschanffen e Siegiel, 2000). O primeiro estágio representa a transição da fase de vigília para o sono. O EEG mostra atividade de baixa voltagem e frequência variada. No segundo estágio observam-se ondas de alta voltagem, já no terceiro estágio há a presença de ondas lentas de alta amplitude (ondas delta). No quarto estágio há predominância de ondas lentas. Os estágios três e quatro são chamados de sono de ondas lentas (Rechatschanffen e Siegiel, 2000).

Durante o período de sono nREM a atividade neuroendócrina está aumentada, havendo picos de liberação de hormônio do crescimento e dos hormônios gonadotróficos.

Sono REM ou paradoxal

Nessa fase do sono, registros EOG mostram alta atividade da musculatura ocular com movimentos oculares rápidos e de alta frequência (Aserinsky e Kleitman, 1953) (Fig.1). O termo REM desta fase origina-se da abreviação inglesa para “rapid eye movement”.

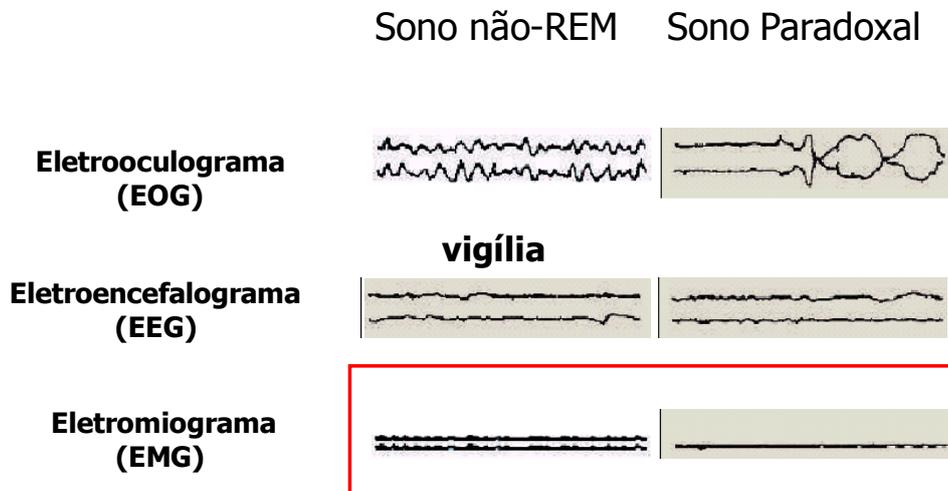
Nos registros EEG observa-se uma alta atividade de neurônios corticais, semelhante à observada durante a vigília (Jouvet e col., 1964) (Fig.1). Esta característica torna o sono REM também conhecido por fase ativa do sono. Já em relação aos registros EMG, há uma baixa atividade elétrica (Fig.1). Isso porque há uma atonia da musculatura esquelética, mantendo-se ativos somente os músculos que movimentam os olhos, os ossos do ouvido médio e o diafragma (Rechtschaffen e Siegel, 2000).

Em 1962 Jouvett criou o termo sono paradoxal, pois apesar de uma atividade cortical semelhante à encontrada na vigília, ocorre também uma atonia muscular.

É durante essa fase que ocorrem os sonhos mais bem estruturados (Reinoso-Suarez e col., 2001). Ao se despertar durante o sono paradoxal, relatam-se detalhes vívidos de sonhos, indicando que o sonho é um comportamento associado com a ativação do encéfalo no sono paradoxal.

Dormir e descansar podem ser satisfatoriamente explicados como estados de adaptação, cuja função central é a conservação de energia e regulação do comportamento (Siegel, 2009). Além dessas funções, certos processos de recuperação podem ser realizados dentro de sono. No entanto, apesar de vários trabalhos associarem a fase de sono paradoxal a determinadas funções e comportamentos, o papel adaptativo dessa fase permanece ainda um mistério. Os altos níveis de demanda metabólica cerebral e a atenuação da regulação homeostática tornam difícil o entendimento de como os seres vivos podem beneficiar-se deste estado.

Figura 1- Registros elétricos do sono nREM e sono paradoxal

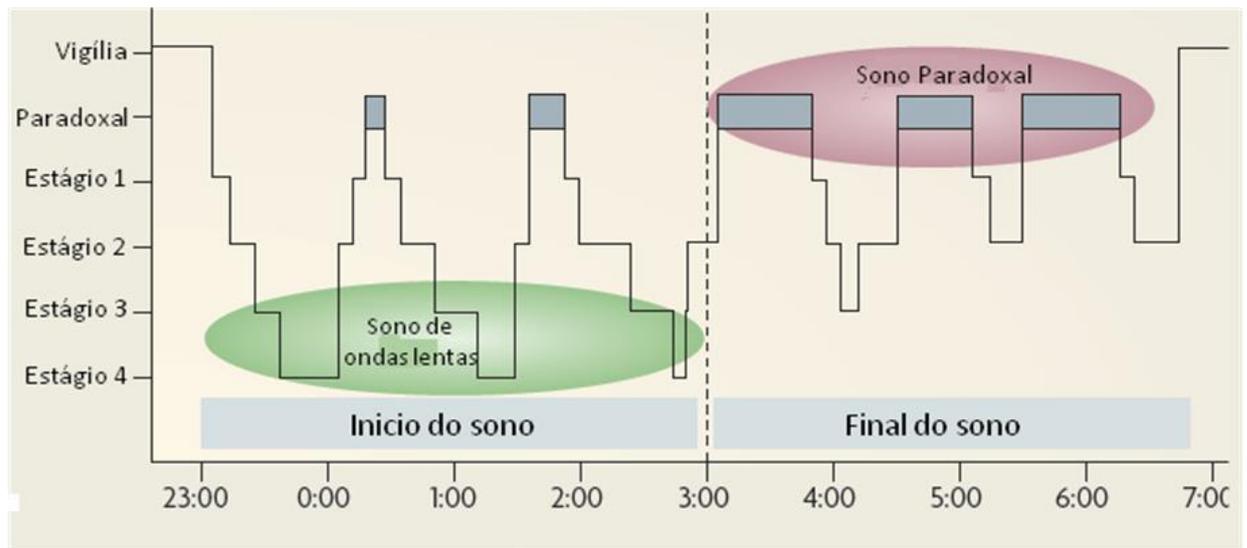


Arquitetura do sono

Durante todo o período de sono, as fases de sono paradoxal e nREM se alternam de forma cíclica e organizada (Fig.2) (Hobson, 1999). Acontecem normalmente de 4 a 6 ciclos de sono por noite. Os estágios 1 e 2 do sono nREM são os primeiros a aparecer durante o

período de sono, e muitas vezes alternam com breves episódios de vigília antes do início do sono profundo (estágios 3 e 4). O sono nREM predomina nas primeiras horas de sono enquanto que o tempo de sono REM aumenta nas últimas (para revisão ver: Tufik e col., 2009).

Figura 2 - Arquitetura do sono



Legenda: O sono é caracterizada pela ocorrência cíclica de sono REM e sono nREM, que inclui sono de ondas lentas (estágios 3 e 4)

Fonte: Adaptado de Diekelmann e Born, 2011.

Mecanismos neurais do sono Paradoxal

Neurônios monoaminérgicos localizados no Locus Coeruleus (LC) chamados de REM-off e neurônios colinérgicos chamados de REM-on localizados tegmento pontomesencefálico são responsáveis pela modulação do sono paradoxal. Os neurônios REM-on estão ativados durante essa fase do sono e os neurônios REM-off são responsáveis pelo seu término (Pal e Mallick, 2007).

A ativação de neurônios REM-on induz a liberação de acetilcolina que ativa interneurônios GABAérgicos no LC, estes por sua vez, inibem os neurônios REM-off. Neurônios REM-off ativos inibem neurônios REM-on. Desta forma a inibição de REM-off facilita a atividade de neurônios REM-on, resultando no início do sono paradoxal (Pal e Mallick, 2007).

A supressão do tônus muscular no sono paradoxal é mediada por interconexões de vários tipos de células REM-on que estão localizadas na ponte e no bulbo. O tônus muscular é diminuído por um sistema descendente. Os neurônios colinérgicos da ponte ativam neurônios glutamatérgicos, que se projetam para o bulbo, onde fazem conexões com interneurônios que liberam glicina. Esta liberação de glicina hiperpolariza os neurônios motores, produzindo a paralisia motora do sono paradoxal (Reschtschaffen e Siegel, 2000).

Privação de Sono

O sono é uma parte essencial da vida humana e é necessário para a saúde. Distúrbios do sono causados por doenças, exigências profissionais ou até lazer, contribuem para a diminuição do rendimento no trabalho e na escola. A sonolência é atualmente reconhecida como um fator com grande contribuição nas taxas de acidentes devido à perda de reflexos (Phillip e Akerstedt, 2006). Hoje as pessoas tendem a dormir cada vez mais tarde e acordar cada vez mais cedo. Por esse motivo acabam tendo uma privação parcial de sono paradoxal, pois é no final da noite que os episódios de sono paradoxal acontecem com maior duração e frequência. Nos últimos cinquenta anos ocorreu uma redução de aproximadamente 2 horas na duração diária do sono (Banks e Dings, 2007). Este débito de sono tende a ser compensado com um aumento de tempo de sono nos finais de semana, contudo, a reposição ou rebote ocorre para os estágios 2 e 3 da fase de sono nREM (Banks e Dings, 2007).

Uma das formas de se estudar as funções do sono é através da observação das alterações em sistemas de neurotransmissores e seus receptores quando há a privação do mesmo (Rechtschaffen e col., 1989; Rechtschaffen e Bergmann, 2002, Tufik e col., 2009). A privação de sono paradoxal (PSP) gera várias alterações comportamentais em animais e humanos. Em ratos essa privação leva a um aumento da atividade motora, irritabilidade, ingestão de alimento, diminuição do limiar de dor, aumento da atividade sexual e alteração na memória (Cohen e Dement, 1965; Albert e col., 1970; Sloan, 1972; Tufik, 1981; Onen e col., 2001; Ferraz e col., 2001; Damasceno e col., 2008; 2009, Skinner et al., 2011; McCoy e Strecker, 2011).

As alterações são decorrentes de mudanças primárias em vários sistemas de neurotransmissores centrais. A privação de sono também pode causar alteração na expressão de diferentes genes no encéfalo, incluindo genes que codificam proteínas envolvidas em processos metabólicos, plasticidade neural e em genes que codificam

neurotransmissores, receptores hormonais, transportadores e enzimas (para revisão ver: Tufik e col., 2009).

As técnicas de privação de sono paradoxal consistem em manter os animais experimentais acordados durante essa fase específica. Grande parte dos modelos utilizados para PSP são modificações de um modelo desenvolvido por Jouvet e col. (1964), conhecido como técnica de pote de flor invertido. Essa técnica consiste na utilização de plataformas circulares estreitas de 6 centímetros de diâmetro, alocadas no interior de tanques contendo água até cerca de 1 centímetro abaixo da superfície da plataforma, onde cada rato é mantido durante o período de privação. Neste modelo durante a vigília e a fase de sono nREM o animal equilibra-se sobre a plataforma. No início da fase de sono paradoxal, em função da atonia da musculatura esquelética característica da fase, o animal entra em contato com a água, acordando subsequentemente. Através desta técnica a fase de sono paradoxal é eliminada completamente. Ocorre também uma pequena redução no sono de ondas lentas (Machado et al., 2004).

Aprendizado e Memória

O aprendizado é definido como o processo de adquirir novas informações ou conhecimento e a memória é tipicamente definida como a capacidade de retenção da informação aprendida (Thompson e col., 2002). O processo de memória é dinâmico e pode ser modificado através de diversos fatores como: por uso de drogas (Claro e col., 1999; Patti e col., 2005), estresse (McEwen e Sapolsky, 1995; Sandi e Pinelo-Nava, 2007) e privação de sono (para revisão ver: Rauchs e col., 2011),

Do ponto de vista fisiológico, o aprendizado e a memória são interdependentes, estando ligados ao processo de desenvolvimento de prolongamentos neuronais e ao estabelecimento de circuitos lógicos de memória. (para revisão ver: Battaglia e col., 2011)

A aprendizagem leva a mudanças de conduta, seja por condicionamento operante, experiência ou ambos, através de técnicas de ensino ou pela simples aquisição de hábitos. A aprendizagem humana envolve a vontade de aprender, característica essencial do psiquismo humano, e é um processo dinâmico e criativo, ou seja, sempre em mutação e em busca de novos métodos de aprendizagem. Assim, difere do adestramento dos demais animais, que é condicionante. Nos últimos tempos, tem sido demonstrada a capacidade de crescimento do cérebro, não no sentido do aumento do número de neurônios, mas sim no acréscimo de conexões neuronais, como mecanismos de memória. Estudos demonstraram que animais que

são mantidos em um ambiente rico em estímulos apresentaram córtex cerebral mais espesso do que aqueles criados isolados ou em ambiente pobre em estímulos, em virtude de novas ramificações nos neurônios pré-existentes em resposta às experiências e à aprendizagem. Percebe-se que o aumento da atividade mental é acompanhado por muitas mudanças no metabolismo encefálico, por aumento do fluxo sanguíneo e da temperatura corporal (Cortez e Silva, 2008).

A memória pode ser dividida em memória de curto prazo e longo prazo. A memória de curto prazo tem uma capacidade limitada e dura apenas por um período de vários segundos a um minuto. À medida que a memória vai sendo consolidada, passa a ser denominada de longo prazo, que armazena grande quantidade de informação para duração potencialmente ilimitada (Fig.3).

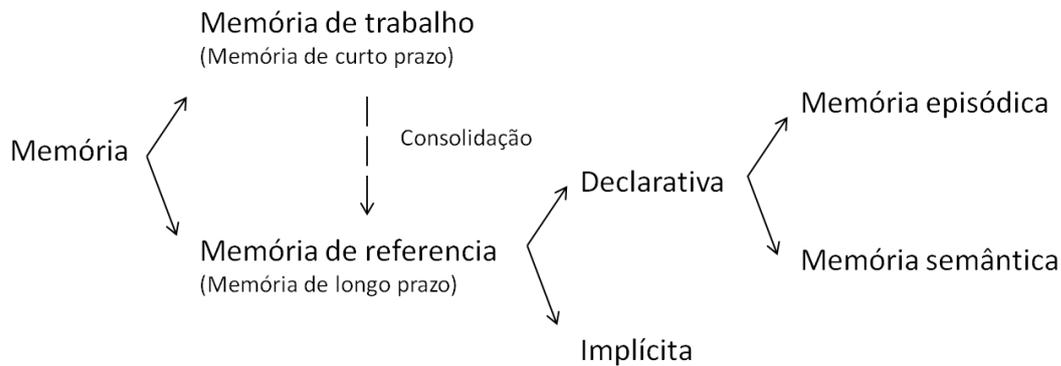
Figura 3 - Representação do mecanismo de aprendizado e memória



Fonte: Adaptado de Born e Wagner, 2009.

A memória de longo prazo pode ser dividida em declarativa (explícita) ou não-declarativa (implícita) (Fig.4) (Para revisão ver: Koehl e Abrous, 2011; McCoy e Strecker, 2011).

Figura 4 - Categorias de sistemas de memórias



Fonte: Adaptado de McCoy e Strecker, 2011.

Com base nos conhecimentos sobre os diferentes tipos de memória e em que um desses tipos pode ser afetado sem no entanto outros serem, podemos concluir que várias regiões encefálicas são responsáveis pelo aprendizado e memória. No entanto, estudos experimentais relacionados à consolidação de memória revelam alterações moleculares no hipocampo e na área do neocortex, envolvendo síntese protéica e expressão gênica, o que indica serem essas as regiões principais do encéfalo envolvidas no comportamento de aprendizado e no controle da formação da memória (para revisão ver: Battaglia e col., 2011). São descritos 4 estágios para a consolidação: aprendizagem, consolidação da aprendizagem, armazenamento e possibilidade de recuperação, cujos mecanismos vêm sendo estudados. Desses estudos, 3 modelos foram elucidados: o primeiro estabeleceu que a memória fosse primeiramente estabelecida no hipocampo e posteriormente armazenada no neocortex; o segundo propõe que eventos repetidos proporcionam um armazenamento mais rápido na região hipotalâmica, portanto estocados no neocortex mais rapidamente; e o terceiro modelo, chamado de Teoria Múltipla do Vestígio propõe que a região hipocampal rapidamente armazena a informação (Dash e col., 2004).

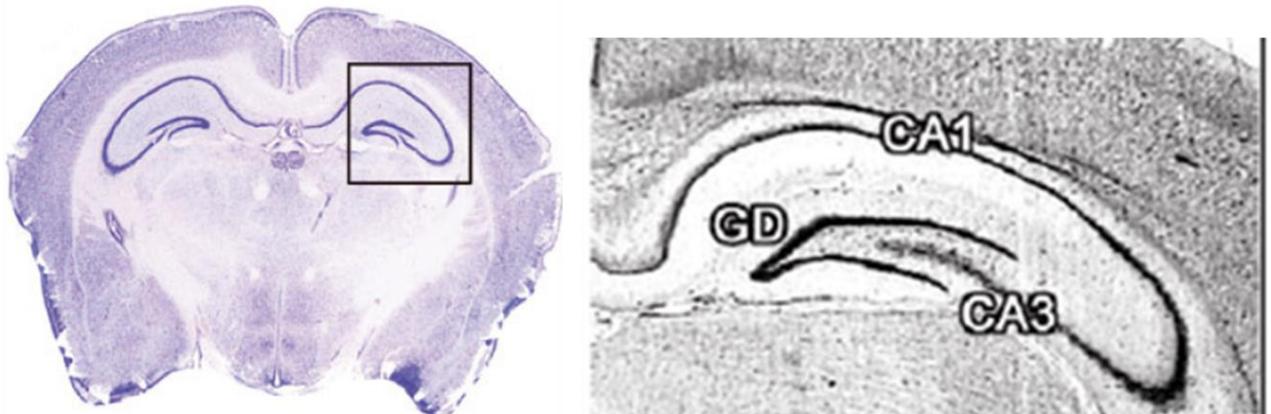
A formação hipocampal contém células com propriedades eletrofisiológicas capazes de formar representações de espaço (células de lugar) (Moser e col., 2008), sendo o hipocampo, portanto uma região importante para tarefas que dependem da combinação de pontos de referência, como em certas tarefas de memória espacial (O'keefe e Nadel, 1978).

Lesões seletivas no hipocampo causam prejuízos no desempenho de reconhecimento espacial em seres humanos (Manns e col., 2003), macacos (Beason-Held e col., 1999) e roedores (Clark e col., 2000).

Hipocampo

O complexo hipocampal (Fig. 5) está localizado no lobo medial temporal do cérebro e se origina do telencéfalo dorsomedial. Através de análise histológica pode-se dividir o hipocampo em duas regiões: o Corno de Ammon (CA) e Giro denteado (GD). A camada de células neuronais primárias do CA é composta por neurônios piramidais glutamatérgicos excitatórios. A camada de células piramidais está presente em todo CA. Os neurônios piramidais apresentam diferentes propriedades morfológicas e genéticas, sendo divididos nas regiões CA1 e CA3. Ainda existe a região CA2 que é uma região de transição entre a CA1 e CA3 (Tole e col., 1997).

Figura 5 - Fotomicrografia de secção coronal de encéfalo de rato, mostrando a localização e regiões do hipocampo (CA1, CA2, CA3 e GD).



Fonte: O autor.

Embora tenha havido amplo debate sobre o papel preciso do hipocampo em várias funções do sistema límbico, hoje é aceito que as suas funções mais importantes são o processo de aprendizagem e a formação de memórias de longo prazo. Acredita-se que o mecanismo celular envolvido na memória é a Potencialização de Longa Duração (LTP, sigla vinda do inglês: *long term potentiation*) (Malenka, 2003; Lynch, 2004).

LTP é uma forma de plasticidade sináptica que se refere à melhoria na transmissão de sinal de sinapses excitatórias, que persiste por longos períodos de tempo após sua indução (Lynch, 2004). No hipocampo, a LTP nas sinapses das regiões CA3-CA1 dos neurônios piramidais é amplamente estudada e é comumente usada como um sistema experimental para avaliar o aprendizado e a memória em modelos animais. Existem 3 fases sequenciais de LTP: a potenciação de curto prazo (STP, sigla vinda do inglês: *short term potentiation*); LTP precoce (E-LTP, sigla vinda do inglês: *early short term potentiation*), ambos os fenômenos

são transitórios e independem de transcrição de genes e síntese de proteínas; e LTP tardia (L-LTP), que dura de várias horas *in vitro* ou semanas *in vivo* e exige mudanças de expressão gênica e síntese de proteínas (Lynch, 2004; Sweatt, 1999). As mudanças na expressão gênica contribuem para o aumento no número de espinhas dendríticas, que formam a área de superfície sináptica, liberação pré-sináptica de neurotransmissores e aumento da sensibilidade pós-sináptica para neurotransmissores (Lynch, 2004; Malenka e Bear, 2004).

Os processos de LTP são iniciados pela ativação da sinalização de cascatas como, da proteína cinase A (PKA), da proteína cinase C (PKC), da cálcio/calmodulina cinase (CaMKII) e da cascata extracelular das cinases reguladoras de cascatas (ERK) (Dash e col., 2004). A entrada de cálcio ocorre por intermédio dos receptores de NMDA (N-metil D-aspartato) que promovem uma interação entre a cálcio/calmodulina com a CaMKII, o que promove o deslocamento da mesma para a área da zona pós-sináptica pela ligação do carbono terminal do receptor de NMDA em subunidades de NR2S (Sigla vinda do inglês: *nuclear receptor*) (Bayer e col., 2001). Os receptores de NMDA são conhecidos por serem compostos por NR1 e outras subunidades de NR (NR2A, NR2B, NR2C). Esta potencialização em longo prazo ocorre mediante síntese de proteínas e do aparecimento da proteína ligante de elemento responsivo a AMPc, CREB (sigla vinda do inglês: *cAMP-responsive element-binding*) mediante a ativação da expressão gênica (Rubinson e Lang, 2009).

Sono e Memória

Vários estudos já demonstraram uma interação entre sono e memória, sendo consenso o papel do sono na consolidação da memória (para revisão ver: Diekelmann e Born, 2011). A consolidação da memória ocorre mais eficazmente durante o sono, já que dormindo os organismos não recebem informações externas que poderiam gerar confusão ou interferir no armazenamento das informações obtidas quando em vigília. Não está claro até ao momento a quantidade de sono necessária para a consolidação, nem o intervalo de tempo necessário entre o aprendizado e o episódio de sono necessário para consolidação. Os resultados, que não podem ser extrapolados entre as diferentes espécies experimentais, variam de minutos a dias (para revisão ver: Diekelmann e Born, 2011). Da mesma forma, vários trabalhos na literatura descrevem que a privação de sono depois de uma sessão de aprendizado resulta em um *déficit* de memória em humanos (Plihal e Born, 1999; Stickgold e col., 2000) e em animais experimentais (Graves e col., 2003; Fishbein e col., 1971; Linden e col., 1975). A privação de

sono tem sido uma ferramenta útil para avaliar os efeitos do sono no aprendizado e memória, porém as metodologias utilizadas, que se baseiam sempre em sucessivos despertares podem gerar estresse, que por sua vez pode também influenciar na consolidação da memória. Desta forma várias críticas têm sido feitas aos diferentes resultados obtidos (Rauchs e col., 2005).

Tanto o sono nREM como o sono paradoxal têm sido implicados na consolidação da memória (Kryger e col., 2000).

Sono Não REM e Memória

Todos os estágios dessa fase de sono têm sido relacionados com a consolidação da memória (De Gennaro e Ferrara, 2003), embora a maior parte dos trabalhos seja sobre os estágios 3 e 4 (sono de ondas lentas), que parecem ter um papel muito importante na consolidação da memória declarativa. Nestes estágios a atividade colinérgica é mínima, o que poderia favorecer uma atividade hipocampal espontânea (Diekelmann e Born, 2011; Hoffman e col., 2007). Nestes estágios a liberação de glicocorticóides também é mínima, o que favoreceria o fluxo de informação entre hipocampo e néocortex (Wagner e Born, 2008).

Sono Paradoxal e Memória

Um aumento na quantidade e intensidade de sono paradoxal é registrado no sono subsequente a tarefas de aprendizado, sendo essa fase de sono associada à consolidação da memória não declarativa (de procedimentos) (para revisão ver: Diekelmann e Born, 2011; Fishbein e col., 1974). Esse aumento pode ser observado durante horas e até dias após o aprendizado, dependendo da metodologia utilizada. Corroborando a hipótese, vários trabalhos descrevem enfraquecimento de memória quando ocorre privação dessa fase de sono. Vários trabalhos descrevem que a PSP realizada tanto antes, como após o aprendizado reduz a consolidação da memória em tarefas complexas, como o aprendizado em um labirinto complexo e condicionamento instrumental (Hennevin e Leconte, 1977; Peigneux e col., 2001).

Estudos realizados no departamento de psicologia da UNIFESP, demonstraram que noventa e seis horas de PSP reduzem a performance de ratos em vários modelos de avaliação

de memória, como esQUIVA inibitória e na versão espacial do labirinto aquático (Tiba e col., 2008).

Nessa fase a atividade colinérgica é similar à da vigília, o que suportaria a potencialização de longa duração (Aguiar, 2008).

Molecularmente, pouco se sabe ainda sobre a o efeito do sono paradoxal no processamento da memória. Porém, a PSP está associada a uma menor ligação de noradrenalina a seus receptores beta adrenérgicos em todo o encéfalo, o que pode resultar em problemas na memória devido a diminuição nos níveis de AMPc através da estimulação de guanilato ciclase (Hipólido e col., 1998). A PSP também tem sido associada a baixos níveis de CREB fosforilada (Vecsey e col., 2009).

Hormônios Corticosteróides

O eixo Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal (HPA) está envolvido na modulação da secreção de hormônio corticosteróides pelas glândulas adrenais (cortisol no homem ou corticosterona em ratos), que desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase. Esses hormônios são fundamentais para o início e o término adequado da resposta ao estresse. Suas ações incluem regulação de funções cerebrais como excitabilidade neuronal e liberação de neurotransmissores (Joels, 2008), modulação da neurogênese e aprendizado e memória (Herbert e col., 2006); regulação de vários comportamentos e regulação neuroendócrina (Oitzl e col., 1997).

Níveis elevados de hormônios corticosteróides podem prejudicar a homeostase e causar danos graves às funções encefálicas e por isso são considerados fatores de risco para incidência de transtornos relacionados ao estresse como depressão (para revisão ver: De Kloet e col., 2005).

Na resposta ao estresse os hormônios corticosteróides agem de forma a manter a atividade basal do sistema HPA e controlar a sensibilidade da resposta ao estresse. Desta forma, promovem a coordenação de eventos circadianos como a ingestão alimentar e sono-vigília, estão envolvidos no processo de integração sensorial e atenção seletiva e por mecanismos de retroalimentação negativa facilitam o término da ativação do HPA (para revisão ver: De Kloet e col., 1998).

Características dos receptores de Corticosteróides

Quando os hormônios corticosteróides penetram no encéfalo, se ligam a receptores intracelulares. Os receptores fazem parte de complexos multiproteicos que se localizam no citoplasma celular. Após a ligação do hormônio ocorre dissociação de chaperonas, aumento da afinidade receptor-ligante e migração do complexo receptor-hormônio para o núcleo. Esse complexo funciona como um fator de transcrição gênica (Munck e col., 1990; Brink e col., 1992).

Existem dois subtipos de receptores de corticosteróides no encéfalo: Receptores de Mineralocorticóides (RMn) e Receptores de Glicocorticóides (RGc) (Joels e col., 2008). RMn e RGc coexistem em neurônios e a ação dos hormônios corticosteróides são mediadas por esses receptores que agem de forma sinérgica ou antagonista dependendo da função celular (Van Eekelen e col., 1988).

Os RMn estão localizados predominantemente em áreas límbicas, particularmente na região do hipocampo nas regiões CA1/CA2 e GD. Esses receptores apresentam uma alta afinidade pelos hormônios corticosteróides e são necessárias baixas concentrações de corticosteróides para a sua ativação (Herman e col., 1989; Pryce, 2008).

Já os RGc se encontram amplamente distribuídos em todas as regiões do encéfalo inclusive no hipocampo. São necessárias altas concentrações de hormônios corticosteróides para ativá-los e a afinidade do hormônio ao receptor é cerca de dez vezes menor quando comparado ao RMn (para revisão ver: De Kloet e col., 1993).

Com presença de ambos os receptores em neurônios hipocampais é necessário que haja um equilíbrio adequado na ação dos hormônios corticosteróides, pois o equilíbrio é fundamental para atividade neuronal, capacidade de resposta ao estresse e na consolidação do aprendizado e memória (McEwen e Sapolsky, 1995; De Kloet e col., 1998; Lai e col., 2007; Pryce, 2008; Sousa e col., 2008; Rogalska, 2010). Alterações na relação de equilíbrio para os receptores RMn/RGc tem efeitos sobre a regulação na resposta ao estresse, riscos crescentes de neuropatologias e danos no aprendizado e memória (Hásson e col., 1996; Almeida e col., 2000; Sapolsky, 2000; Rogalska 2010).

Memória e Glicocorticóides

A função de hormônios corticosteróides na aquisição, consolidação e recuperação da memória já vem sendo estudada há décadas em modelos animais e humanos (Luine e col., 1993, 1994; Kim e Haller, 2007; Lupien e col., 2007; Shors, 2006).

Existem vários trabalhos relatando o efeito do aumento dos níveis de glicocorticóides relacionados a estresse, aprendizado e memória. Os resultados relatados variam de melhora a enfraquecimento, dependendo de várias variáveis como, sexo, idade, tempo (efeito agudo ou crônico) e intensidade do fator estresse. Entretanto, um bom número de trabalhos descreve que aumento nos níveis de glicocorticóides no hipocampo e consequente super ativação de RGc gera inibição da LTP, e como consequência prejuízos no aprendizado e memória (Foy e col., 1987; Diamond e col., 1992; Pavlides e col., 1995). Alterações estruturais no hipocampo, como redução nas espinhas dendríticas e morte neuronal estariam associadas a estes efeitos (para revisão ver: Wolf, 2003; Li e col., 2011). Já foi também demonstrado que o tratamento agudo com glicocorticóides modula a eficácia sináptica nos neurônios do hipocampo (Diamond e col., 1992; Pavlides e col., 1993; Rowan e col., 1998; Xu e col., 1997).

O aumento na ativação de RMn por sua vez, induz a LTP hipocampal e leva a melhora em testes de memória espacial (De Kloet e col., 1999; Pavlides e col., 1993; Joels e col., 2004). Em acordo com esses dados, o bloqueio experimental desse receptor através de fármacos antagonistas provoca perda de rendimento em testes de memória (Douma e col., 1998).

Sono, Glicocorticóides e Memória

Como já descrito anteriormente, o sono é tido como um estado que otimiza a consolidação de memória de novas informações adquiridas (para revisão: Diekelmann e Born, 2011). Sabe-se também da importância da regulação através de ação em receptores específicos dos hormônios corticosteróides deste estado (para revisão ver: Wagner e Born, 2008). Níveis baixos de glicocorticóides ocorrem durante o sono de ondas lentas que precede episódios de sono paradoxal, levando a uma associação entre esses hormônios, sono e memória. A privação de sono paradoxal pode induzir alterações no aprendizado e memória, descritas em vários trabalhos na literatura que poderiam ser consequentes a alterações nos níveis de glicocorticóides, induzidos pela privação dessa fase específica de sono, ou pelas

técnicas de privação utilizadas . Trabalhos envolvendo privação de sono paradoxal e avaliação de aprendizado e memória têm sido bastante criticados pelos efeitos não específicos induzidos pela técnica, como por exemplo aumento na atividade locomotora e aumento da atividade do eixo HPA (aumento nos níveis de corticosterona), que poderiam ser responsáveis pelas alterações nos testes de aprendizado e memória (Siegel, 2001). O trabalho de Ruskin e col., (2006) contudo, avaliou os efeitos da PSP em ratos adrenalectomizados, cujos níveis de corticosterona foram mantidos estáveis através da liberação por um *pellet* implantado e verificaram que nesses animais a PSP continuou induzindo um enfraquecimento na consolidação de memória, o que mostra que a técnica usada não estaria influenciando no resultado final.

1 OBJETIVO

Considerando-se a importância do sono bem como a importância dos hormônios corticosteróides no aprendizado e aquisição de memória, e também considerando-se que alterações na consolidação não estão relacionadas ao estresse da metodologia de privação de sono, neste trabalho objetivamos estudar o efeito de noventa e seis horas de privação de sono paradoxal:

- a) Na expressão de receptores para glicocorticóides no hipocampo.
- b) Na aquisição e consolidação de memória espacial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 250-300g. Os animais foram criados no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sendo mantidos em ciclo claro e escuro de doze horas (6:00-18:00). Todos os protocolos empregados neste trabalho foram aprovados pela comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais do IBRAG/UERJ (CEUA/032/2010).

2.2 Privação de sono paradoxal

Os ratos foram submetidos à privação de sono paradoxal por período de noventa e seis horas, sendo utilizado o método de múltiplas plataformas (Fig.6) (Van Hulzen e Coenen,1980). Neste método 10 plataformas estreitas (6,5 cm de diâmetro) são colocadas no interior de um tanque (120x40x40cm) cheio de água até 1cm abaixo da superfície da plataforma. Este método permite que os ratos se movam de plataforma para plataforma e mantenham contacto com os outros ratos do mesmo grupo experimental. Durante o experimento, quando o rato alcança a fase de sono paradoxal, a atonia muscular presente nesta fase faz com que o mesmo tenha contacto com a água e desperte. O acesso à alimentação e água é permitido para todos os grupos e neste procedimento obtém-se uma redução de 100% na fase de sono paradoxal e de aproximadamente 30% no sono de ondas lentas (Machado e col., 2004). O grupo controle foi mantido nas mesmas condições, sendo a água no tanque substituída por maravalha. A privação de sono foi realizada em uma sala de avaliação comportamental, sendo os animais retirados do biotério e mantidos em ambientação por 2 dias antes do início da privação de sono ou das avaliações comportamentais.

Figura 6 - Tanque de privação de sono paradoxal



Fonte: O autor.

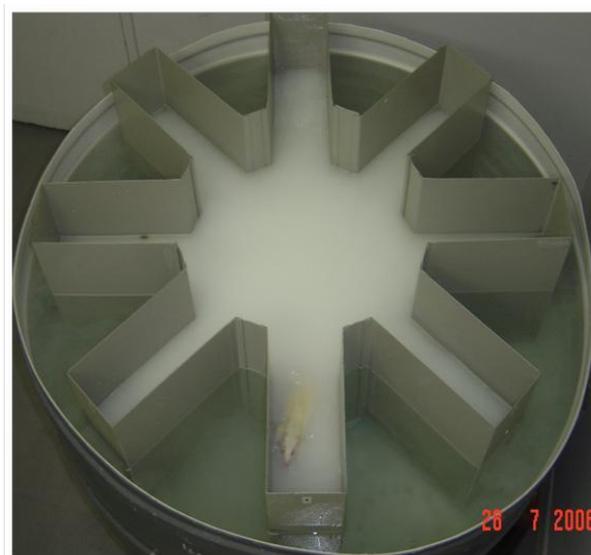
2.3 Avaliação de aprendizado e memória espacial

2.3.1 Teste do Labirinto Aquático Radial de oito braços (LAROBS)

Para avaliação de aprendizado e memória espacial os ratos foram testados no LAROBS (Fig. 7). O LAROBS consiste em um tanque com uma arena central de 41 cm de diâmetro com oito braços radialmente dispostos em relação à arena central formando uma espécie de asterisco (braços: 29 cm comprimento \times 13 cm de largura \times 40 cm de altura). O tanque foi preenchido com água de forma que os ratos não conseguiram tocar o fundo do tanque e nem sair. Na extremidade de um de seus braços foi adicionada uma plataforma que se encontrava submersa a 1 cm da superfície que permite ao animal escapar do labirinto quando encontrada (plataforma de escape: 8 cm de comprimento \times 10 de largura). A adição de tinta guache atóxica gerou opacidade na água com a finalidade de dificultar a visibilidade da plataforma de escape. Antes do início dos testes, as caixas contendo os animais experimentais foram colocadas na sala de avaliação comportamental, em condições ambientais de luz e temperatura semelhantes às da sala de privação de sono. Os testes foram iniciados colocando-se os ratos (individualmente) no centro do tanque em direção oposta ao braço onde era encontrada a plataforma. Pistas espaciais, fixadas à parede (placas de acrílico de cor preta), serviam de orientação para os animais. Os testes foram realizados na fase clara (13:00 a 17:00), numa sala com proteção acústica, e gravados por uma câmera de vídeo posicionada a 1,30 m acima do LAROBS para análise posterior. Foram avaliados os parâmetros: latência de

escape, que consiste no tempo necessário para achar a plataforma e o número de erros obtidos na tentativa de achar a plataforma. Foram utilizados dois protocolos, o primeiro para avaliar o efeito da privação de sono na consolidação da memória pré-aprendizado e o segundo para avaliar o efeito da privação de sono pós-aprendizado. No primeiro (n=6/grupo) cada rato realizou 3 testes separados por um período de trinta minutos de repouso. Cada teste consistia de 3 tentativas sucessivas com sessenta segundos de duração e cerca de sessenta de intervalo entre cada. Uma última tentativa foi realizada 2 horas após a terceira tentativa do terceiro bloco. No segundo (n=12/grupo), os testes foram realizados durante 3 dias sendo 2 dias consecutivos com 4 tentativas e o último teste realizado após o período de noventa e seis horas de PSP. Cada tentativa teve um intervalo de 10 minutos e o animal teve 2 minutos para achar a plataforma. Caso a plataforma não fosse achada, o animal era levado e deixado sobre a plataforma por vinte segundos.

Figura 7 - LAROB



Legenda: Aparato usado para avaliação da latência de escape e quantidade de erros obtidos.

2.4 Análise imunohistoquímica

2.4.1 Perfusão

Após noventa e seis horas de privação de sono paradoxal 6 animais controles e 6 animais do grupo PSP foram sacrificados usando-se a técnica de perfusão intracardíaca, para posterior análise imunohistoquímica.

Os animais foram anestesiados com 70mg/kg de tiopental sódico e tiveram sua caixa torácica aberta por remoção do gradil costal para a exposição do coração. As soluções da perfusão foram infundidas no ventrículo esquerdo por intermédio de uma cânula acoplada a uma bomba perfusora. Uma incisão realizada no átrio direito permitia o escoamento do sangue e das soluções após percorrerem o sistema vascular do animal. Foram utilizadas as seguintes soluções, solução salina 0,9% que visava à remoção do sangue do animal; solução paraformaldeído 4% e 0,5% de glutaraldeído que realizava a fixação dos tecidos; solução paraformaldeído com glutaraldeído acrescida de sacarose a 10% que iniciava a crioproteção.

Ao término de cada perfusão, iniciava-se a dissecação do encéfalo, para que esse fosse mantido em uma solução fixadora acrescida de 10% de sacarose por 3 horas e, depois transferido para uma solução de tampão fosfato 0,1M pH 7,4 acrescido de sacarose a 20% durante a noite a 4°C.

2.4.2 Criosecção

Após esse período os encéfalos foram seccionados coronalmente em um plano contendo a região de interesse: hipocampo, segundo as indicações obtidas no atlas de coordenadas estereotáxicas (Bregma -3,14 a -4,3 mm) (Paxinos e Watson, 1998). Essas regiões foram então armazenadas em pequenos poços de papel laminado, contendo meio de inclusão (OCT tissue tek), para serem congeladas em nitrogênio líquido e seccionadas em criótomo a -20°C na espessura de 25 µm. As secções foram colhidas (4/lâmina) em lâminas (6) cobertas com gelatina-alúmen de cromo 2% e estocadas a -20°C para posterior processamento imunohistoquímico.

2.4.3 Imunohistoquímica para receptor de glicocorticóides (RGc)

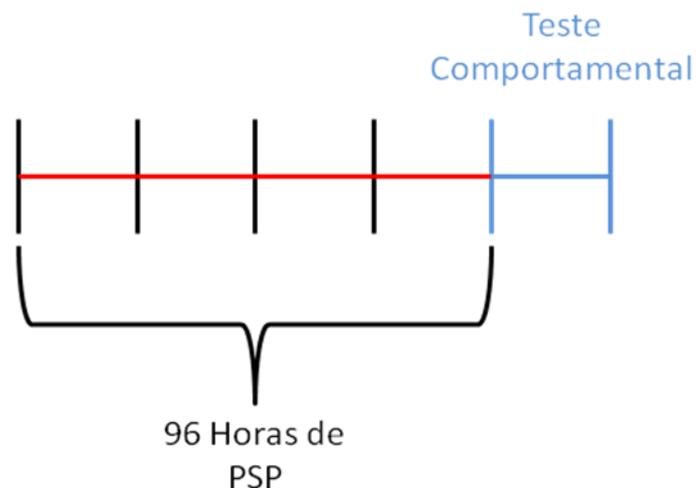
As lâminas destinadas à reação da RGc foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos e depois lavadas 3 vezes com PBS (salina tamponada com fosfato:KCl 2,7mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; NaCl 136 mM e NaHPO₄ 8 mM; pH 7,4) com Triton 0,3%, por 10 minutos. Após a incubação com soro bovino 5% (BSA) por 1 hora, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-RGc na concentração de 1:200 (Santa Cruz, anti-coelho policlonal IgG) por um período de 24 horas a 4°C. Após este período as lâminas ambientavam por duas horas para então serem lavadas novamente com PBS Triton 0,3%. Depois foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente (25°C) com o anticorpo-secundário anti-

coelho conjugado com alexa 488 (M.Probes, IgG) na concentração de 1:200. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS e montadas utilizando N-propil galato como meio.

As lâminas foram observadas sob iluminação fluorescente em um microscópio Olympus RX40 e fotomicrografias de imagens em um aumento de 20x foram obtidas para posterior avaliação, através da câmara Olympus DP 71. Para cada região avaliada (CA1, CA3 e GD), 1 campo de cada secção das lâminas 1, 3 e 6 foi selecionado para avaliação da densidade óptica através do software Image Pro Plus, usando-se a densidade média para análise estatística. A densidade óptica foi avaliada para registro quantitativo da imunoreatividade de RGc entre os grupos experimentais.

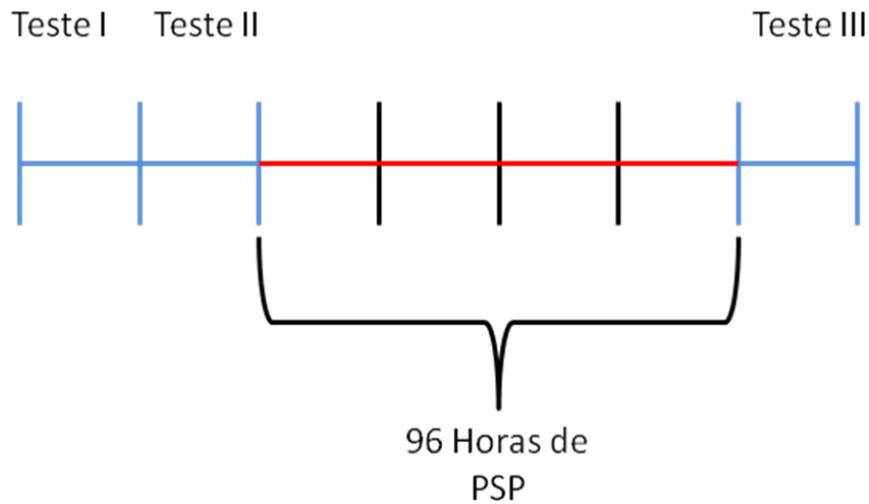
2.5 Desenho experimental

Figura 8 - Desenho experimental: Teste comportamental protocolo 1



Legenda: Ratos foram privados de sono paradoxal por noventa e seis horas, e separados para perfusão e posterior análise imunohistoquímica, ou para avaliação comportamental de memória espacial (pós-privação de sono).

Figura 9 - Desenho experimental: Teste comportamental protocolo 2



Legenda: Ratos foram submetidos ao teste de avaliação de memória espacial por 2 dias (pré-privação de sono), privados de sono paradoxal por noventa e seis horas e novamente avaliados em LAROB.

2.6 Análise estatística

Utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) para análise dos dados comportamentais e imunohistoquímicos. Os dados do teste comportamental e imunohistoquímica passaram pelo teste Kolmogorov Smirnov para se avaliar se os dados estavam contidos na curva normal, caso estivessem era feito teste T não pareado para as amostras, caso contrário era utilizado um teste de Wilcoxon pareado.

3. RESULTADOS

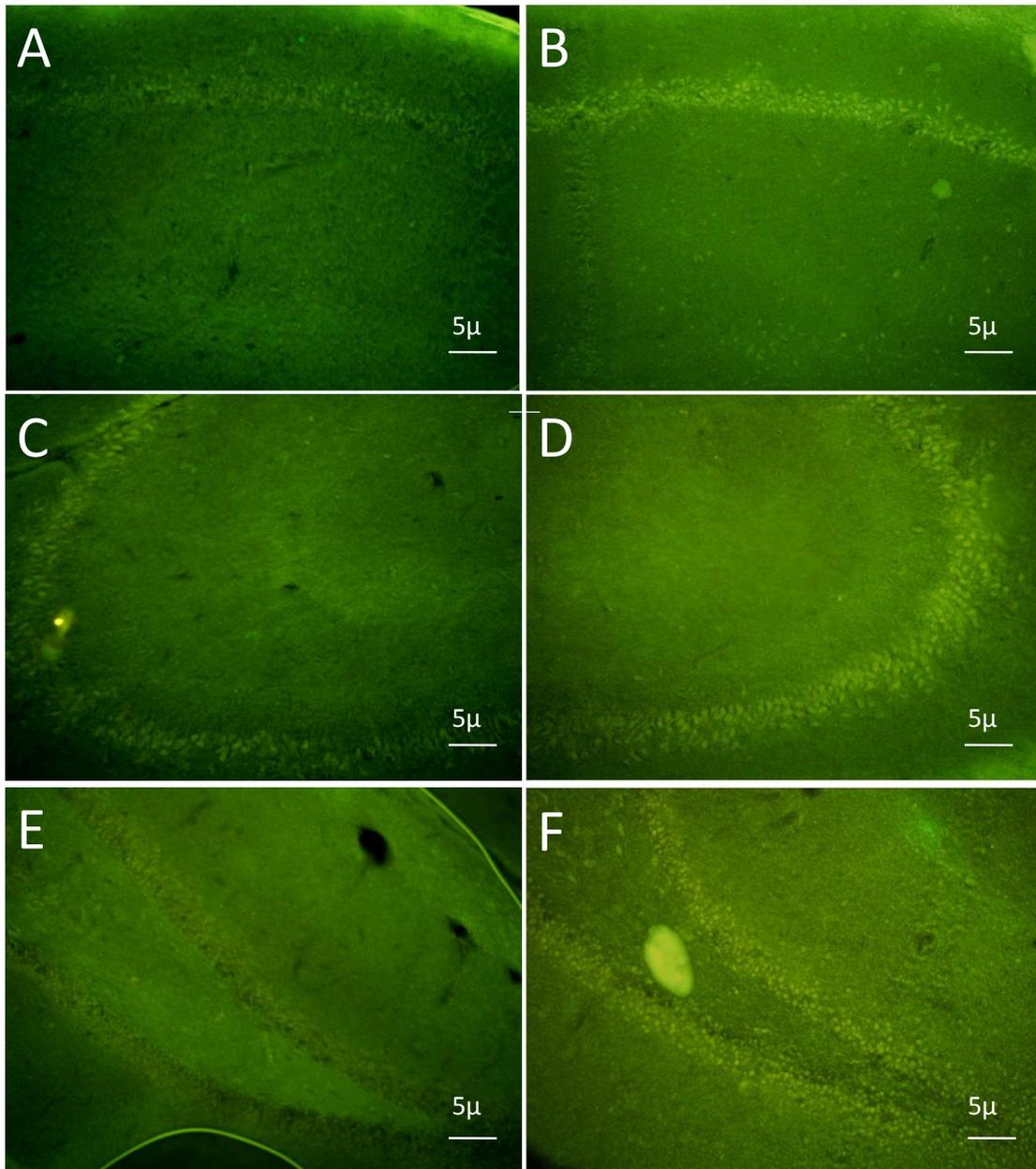
3.1 Efeito da PSP na expressão de RGc.

Na figura 10 observamos foto micrografias representativas de cortes coronais, onde se pode observar o padrão de marcação para RGc em neurônios da região de hipocampo, de ratos controles e privados de sono paradoxal. Observamos marcação nos cortes dos 2 grupos experimentais embora com diferentes níveis de intensidade. A marcação imunohistoquímica para RGc foi tanto nuclear quanto citoplasmática, sendo possível observar uma intensa marcação na camada de células granulares. Observamos aumento na expressão de RGc, através da intensidade de fluorescência, nos cortes de ratos PSP, nas regiões CA1 e GD, quando comparados aos cortes de ratos controles (Fig. 10 B e F). Na região CA3 a marcação observada foi similar nos cortes de ambos os grupos experimentais.

A avaliação quantitativa da imunoreatividade para RGc foi efetuada através da avaliação da densidade óptica, sendo a mesma proporcional à expressão dos receptores (quanto maior a fluorescência emitida, maior a expressão celular).

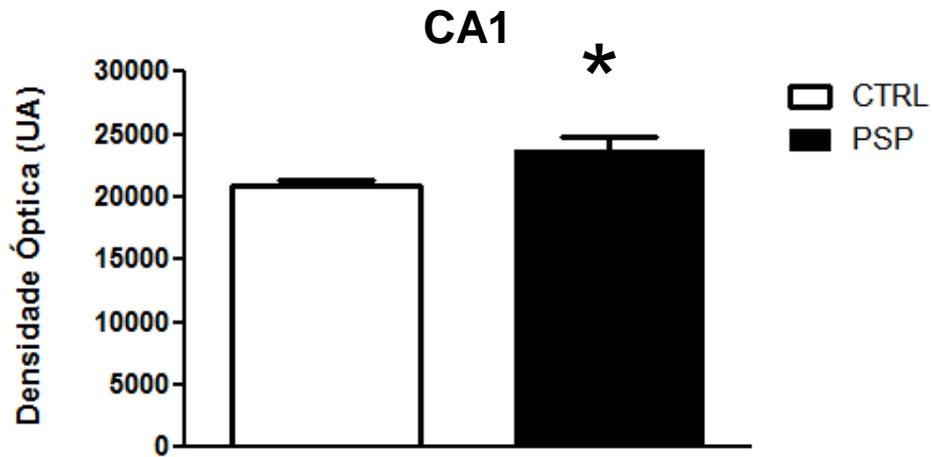
Na região CA1, o grupo PSP apresentou um aumento significativo na densidade média de 13,6% quando comparado ao grupo controle (Fig.11; $P= 0,0298$). Na região CA3, não houve diferença significativa na densidade média entre os grupos (Fig. 12; $P= 0,1048$). Já na região do GD, o grupo PSP apresentou um aumento significativo na densidade média de 19,9% quando comparado ao grupo controle (Fig. 13; $P=0,0239$).

Figura 10 - Fotomicrografias representativas de secções de hipocampo imunoreagidas com anticorpos para receptores de glicocorticóides



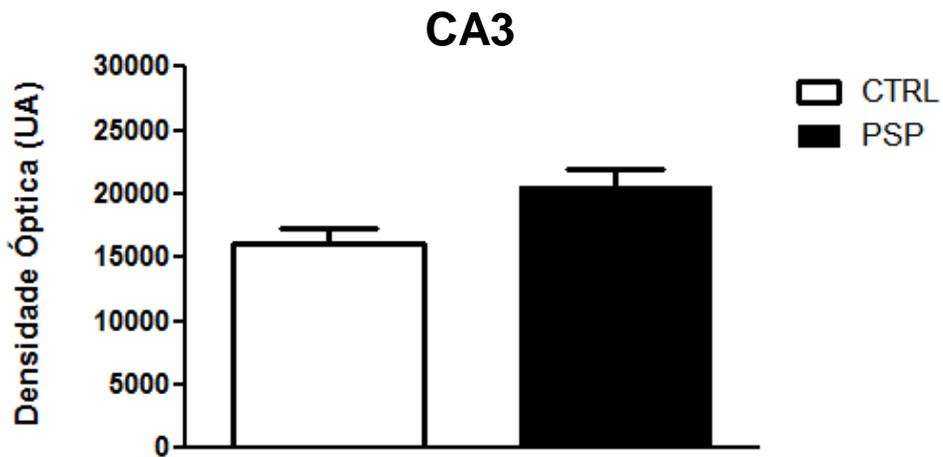
Legenda: (A) CA1 Controle (B) CA1 PSP; (C) CA3 Controle (D) CA3 PSP; (E) GD Controle (F) GD PSP.
Fonte: O autor

Figura 11 - Expressão de RGc na região CA1 do hipocampo de ratos controle e PSP



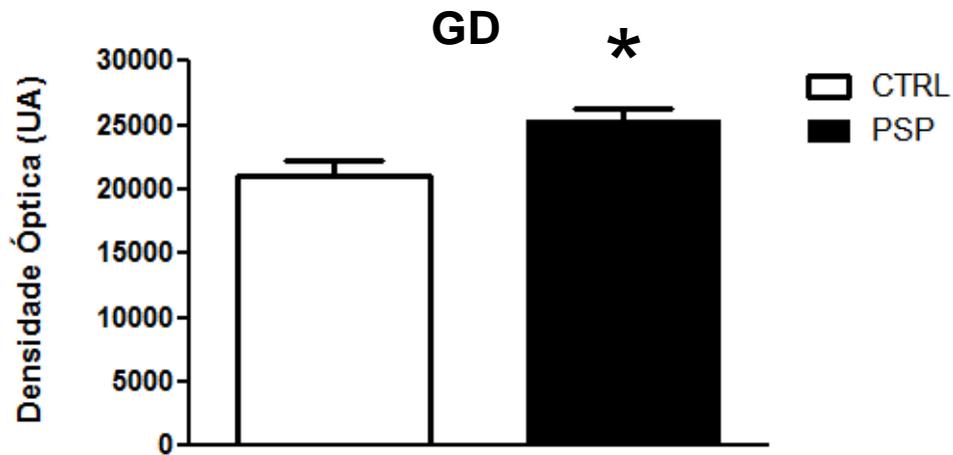
Legenda: Os valores estão expressos como média±erro padrão. Teste t não-pareado entre ratos controles e PSP.
*($P < 0,05$)

Figura 12 - Expressão de RGc na região CA3 do hipocampo de ratos controle e PSP



Legenda: Os valores estão expressos como média±erro padrão. Teste t não-pareado entre ratos controles e PSP.

Figura 13 - Expressão de RGc na região GD do hipocampo de ratos controle e PSP



Legenda: Os valores estão expressos como média±erro padrão. Teste t não-pareado entre ratos controles e PSP.
*($P > 0,05$)

3.2 Análise da avaliação de aprendizado e memória espacial

O teste no labirinto aquático radial de 8 braços teve o objetivo de verificar o efeito da PSP na memória espacial de ratos. Nas figuras 14 e 15 e tabelas 3 e 4 podemos observar o tempo de latência de escape e o número de erros, de animais controle e PSP utilizados no protocolo 1. Neste protocolo foram utilizados 6 ratos por grupo experimental, sendo o grupo PSP submetido a 96 horas de privação e posteriormente ratos controles e privados testados no LAROB. No primeiro teste ambos os grupos apresentaram uma alta latência de escape, não havendo diferença significativa entre os grupos (Fig. 14, tabela 1; $P = 0,5885$). No segundo e terceiro testes houve uma redução semelhante na latência de escape em ambos os grupo (Fig. 14B e C, tabela 1 ; $P = 0,0896$; $P = 0,5625$). No último teste que aconteceu 2 horas após a última sessão do teste 3 os ratos de ambos os grupos apresentaram tempos semelhantes na latência de escape, não sendo observada diferença significativa entre os grupos (Fig. 14D, tabela 1; $P = 0,6250$)

Figura 14 - Latência de escape de animais submetidos ao teste LAROB Protocolo 1

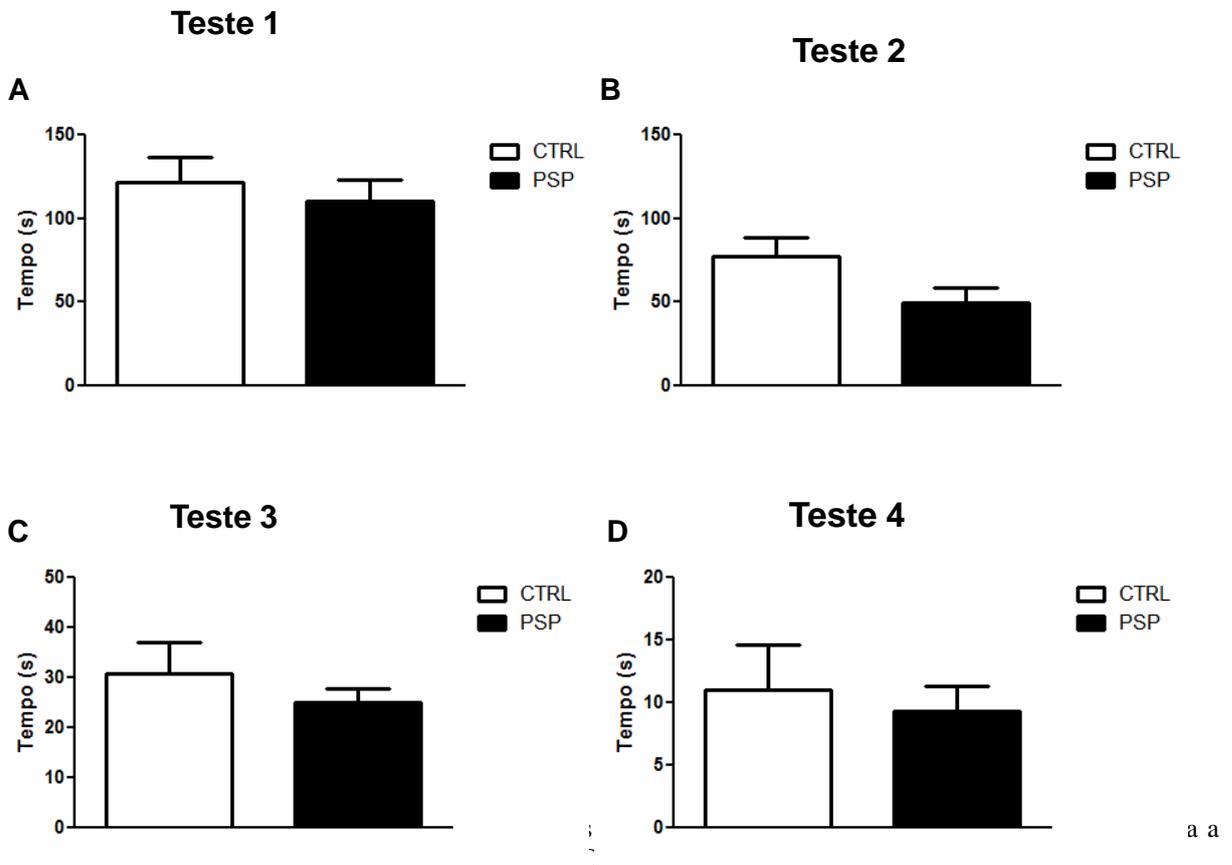


Tabela.1- Latência de escape no LAROB

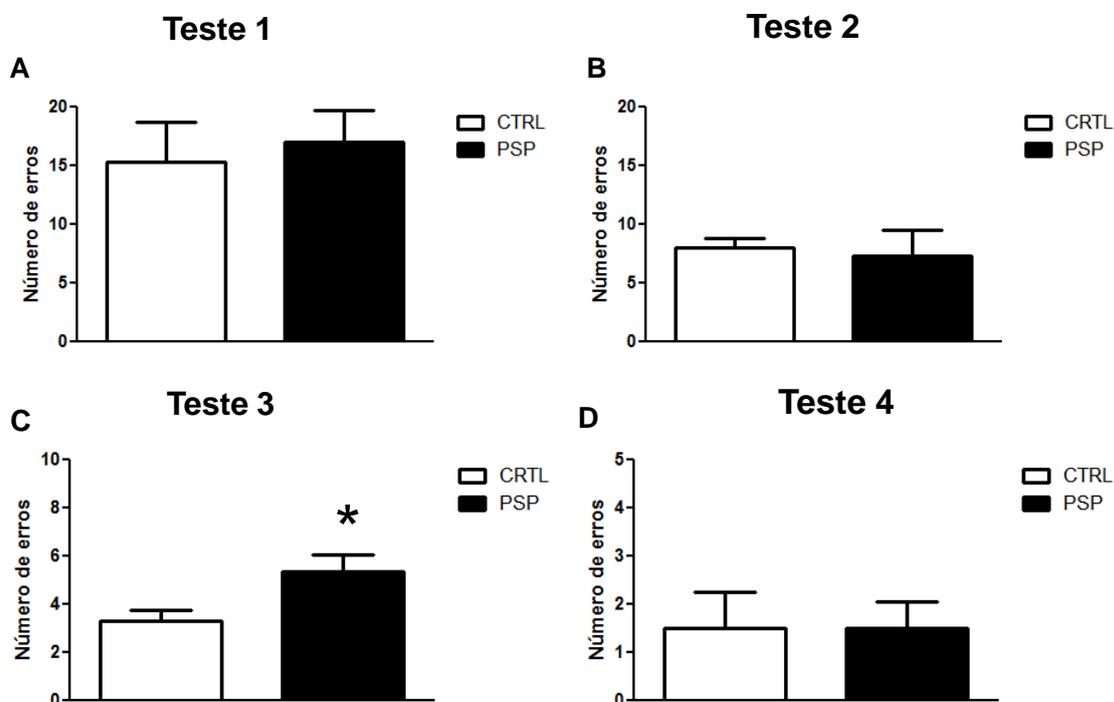
Tabela 1: Latência de escape no LAROB (s).

	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
CTRL				
Teste 1	40,33	39,17	10,17	11
Teste 2	38,5	18,50	13,33	
Teste 3	42,5	19,33	7,33	
PSP				
Teste 1	30,17	23,83	9,17	9,33
Teste 2	43,17	8,67	7,83	
Teste 3	36,83	17,17	8,00	

Na avaliação da quantidade de erros obtidos, vemos que no primeiro teste não houve diferença significativa entre os grupos (Fig. 15, tabela 2; $P=0,7100$). No segundo e terceiro testes houve uma redução na quantidade de erros obtidos semelhante entre os grupos (Fig. 15B e C, tabela 2; $P=0,7796$; $P=0,0367$) o mesmo

acontecendo no quarto teste, que aconteceu duas horas após a última sessão do terceiro teste (Fig. 16D, tabela 4; $P= 1,00$).

Figura 15 - Número de erros de ratos submetidos ao teste LAROB protocolo 1



Legenda: Testes 1, 2, e 3 imediatamente após 96 horas de PSP e teste 4, 2 horas após. Cada barra representa a média±erro padrão de 3 sessões em A, B e C e 1 sessão em D.

Tabela.2 - Número de erros no LAROB

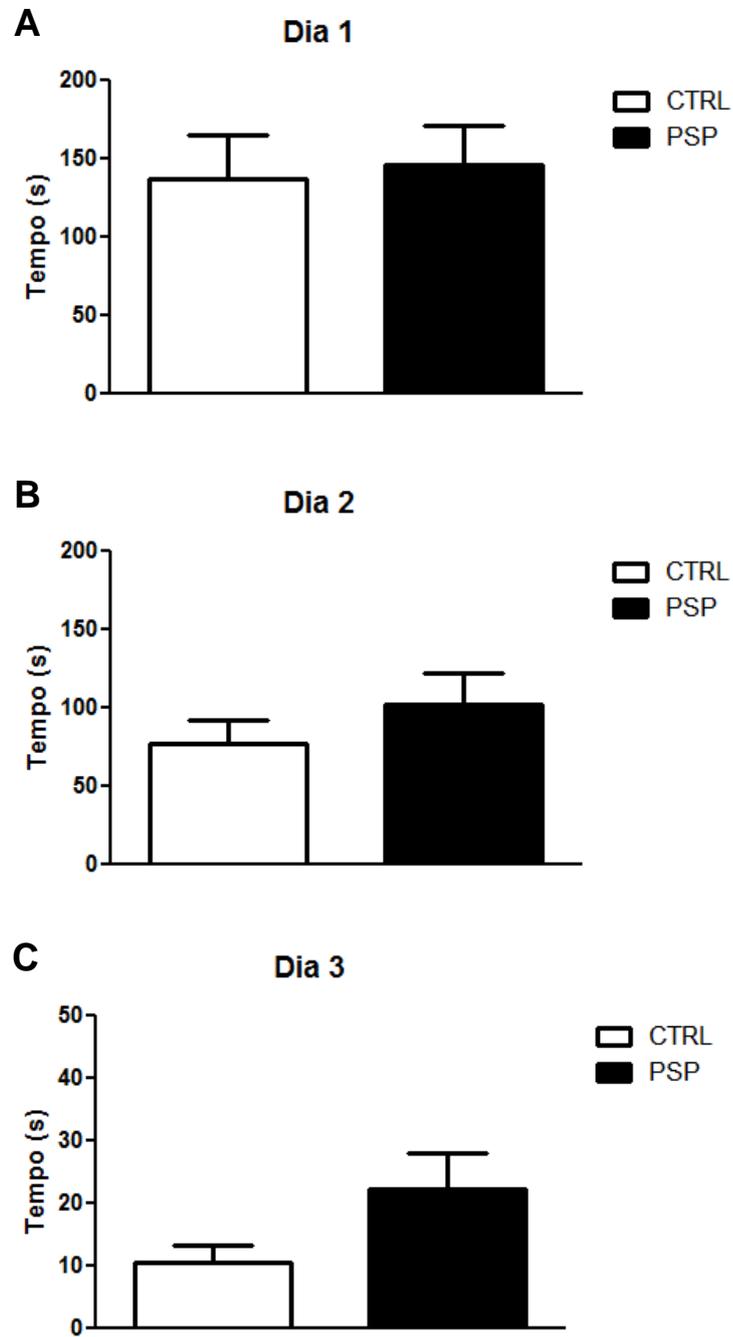
Tabela 2: Número de erros no LAROB.

	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
CTRL				
Teste 1	5	4,66	1,16	1,5
Teste 2	5,16	2	1,66	
Teste 3	5,16	1,33	0,5	
PSP				
Teste 1	5,16	3,5	2	1,5
Teste 2	7,33	0,83	1,67	
Teste 3	4,5	3	1,66	

Nas figuras 16 e 17 e tabelas 3 e 4, podemos observar o tempo de latência de escape e o número de erros, de animais controle e PSP utilizados no protocolo 2. Neste protocolo, utilizamos 12 ratos em cada grupo experimental e observamos que no primeiro teste (dia 1, antes da PSP) ambos os grupos apresentaram uma latência de escape elevada, não havendo

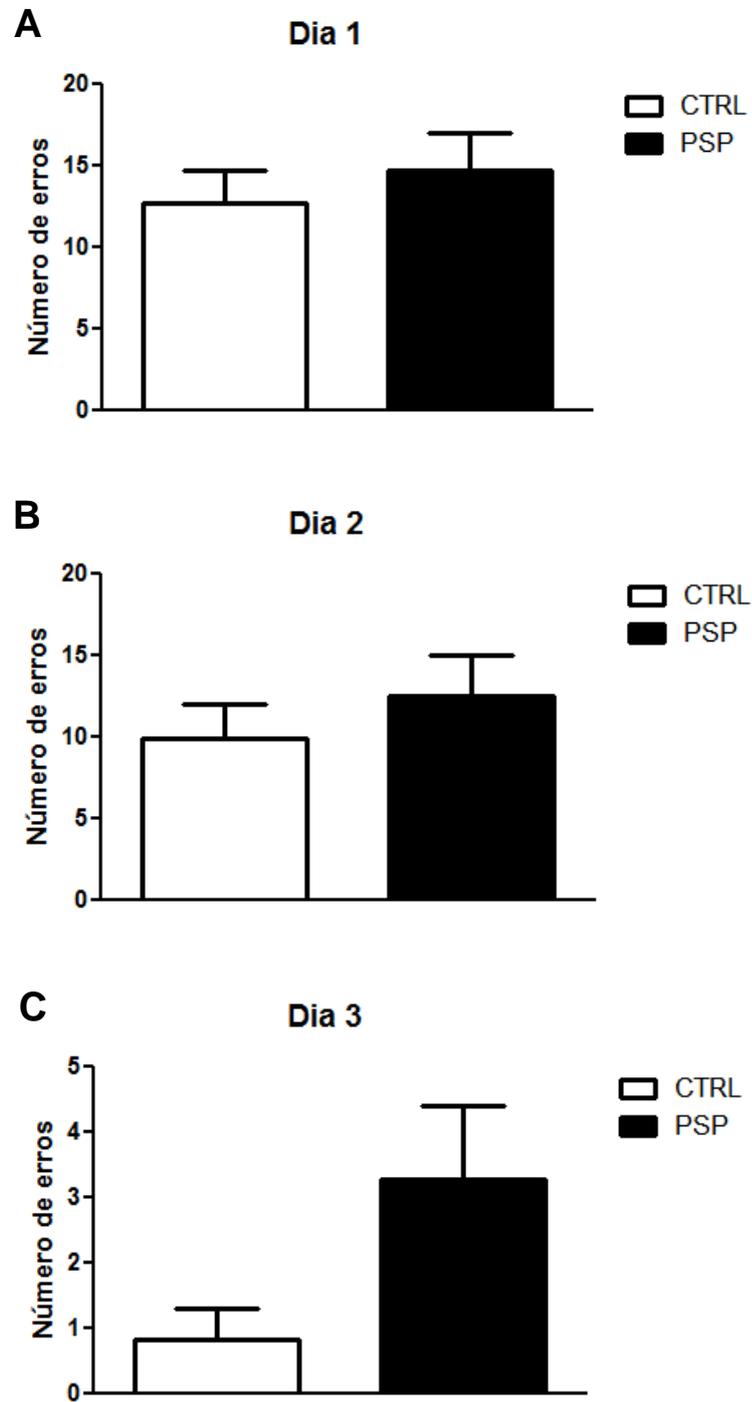
diferença significativa entre os grupos (Fig. 16A, tabela 3; $P= 0,0724$). No segundo teste (dia 2, antes da PSP), houve uma redução na latência de escape, mas também não houve diferença significativa entre os grupos (Fig. 16B, tabela 3; $P= 0,1294$). No terceiro teste, após 96 horas de PSP, os grupos apresentaram uma redução ainda maior na latência de escape, com os animais PSP apresentando valores maiores na latência para localização da plataforma, embora não tenhamos encontrado diferença significativa entre os grupos experimentais com o teste estatístico utilizado (Fig. 16C, tabela 3; $P=0,3054$). Em relação ao número de erros obtidos na tentativa de localização da plataforma, no primeiro dia de teste ambos os grupos apresentaram um número alto de erros, (Fig.17A, tabela 4; $P= 0,4514$). No segundo dia houve uma redução na quantidade de erros obtidos (Fig. 17B, tabela 4; $P= 0,5601$) e no terceiro dia, após 96 horas de PSP apresentaram uma redução ainda maior na quantidade de erros obtidos O grupo PSP apresentou também valores maiores de erros (Fig. 17C, tabela 4; $P=0,2972$), mas não foi observada diferença significativa entre os grupos com o teste estatístico utilizado, nos 3 de dias de testes.

Figura 16 - Latência de escape de ratos submetidos ao teste LAROB protocolo 2



Legenda: A e B dias 1 e 2, antes de o grupo PSP passar pela privação, e C após um período de noventa e seis horas de PSP. Cada barra representa a média±erro padrão de 4 sessões em A e B e 1 sessão em C.

Figura 17 - Número de erros de ratos submetidos ao teste LAROB protocolo 2



Legenda: A e B dias 1 e 2, antes de o grupo PSP passar pela privação, e C após um período de noventa e seis horas de PSP. Cada barra representa a média±erro padrão de 4 sessões em A e B e 1 sessão em C.

Tabela.3 - Latência de escape no LAROB

Tabela 3: Latência de escape no LAROB (s).

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
CTRL			
Teste 1	29,81	33,36	10,45
Teste 2	55,45	15,54	
Teste 3	18,00	15,27	
Teste 4	33,63	12,77	
PSP			
Teste 1	44,72	34,09	22,18
Teste 2	36,09	32,54	
Teste 3	43,63	19,26	
Teste4	21,45	16,00	

4 DISCUSSÃO

A privação de sono pode desencadear várias alterações fisiológicas perigosas que levam a um comprometimento da qualidade de vida entre os seres vivos. Várias situações patológicas, bem como a vida moderna, levam à redução no número de horas de sono e consequentemente ao cansaço, acidentes e ao desenvolvimento de outras patologias (para revisão ver: Tufik e col., 2009). Embora o papel do sono na saúde não esteja ainda totalmente elucidado, são bastantes os trabalhos na literatura que descrevem alterações hormonais, comportamentais e neuroquímicas induzidas pela privação de sono (Tufik e col., 1978; Silva e col., 2004; Spiegel e col., 1999; Andersen e col., 2005; Hipólide e col., 2005; 2006; Damasceno e col., 2008, 2009; Skinner e col., 2011). Particular atenção tem sido dedicada ao estudo dos efeitos da privação de sono no aprendizado e memória. Neste sentido vários trabalhos têm descrito a importância das fases de sono nREM (estágios 3 e 4) e sono paradoxal nestes comportamentos. Como um bom número de pessoas acaba tendo que despertar mais cedo, o sono paradoxal que ocorre em maior quantidade na segunda metade da noite acaba sendo o mais privado e mais relacionado, portanto a alterações fisiológicas e comportamentais. Vários trabalhos têm descrito que o sono após o aprendizado facilita a consolidação e memória de longo prazo, assim como que a PSP após o aprendizado induz a *déficits* na consolidação da memória em humanos e modelos animais (para revisão ver: Hajali e col., 2012). Esses *déficits* ocorrem em diferentes tipos de memória e estão associados ao tempo de privação a que são expostos (para revisão ver: Hajali e col., 2012). Os efeitos da PSP sobre a memória ocorrem em consequência a alterações na excitabilidade das membranas e plasticidade sináptica (McDermott e col., 2003; Ravassard e col., 2009; Alhaider e col., 2010; Guzman-Marin e col., 2006). A PSP causa redução na indução e manutenção de LTP e aumento na depressão de longa duração (LTD) (Tadavarty e col., 2011).

Também já se conhece bem o papel dos hormônios glicocorticóides no aprendizado e memória, onde níveis circulantes muito baixos ou muito elevados podem interferir negativamente na etapa de consolidação (Korte, 2001). As alterações propostas seriam alterações na expressão de receptores para corticosteróides no hipocampo, com fármacos antagonistas para glicocorticóides revertendo essa interferência negativa (Wright e col., 2006)

Considerando-se que as condições de vida moderna, patologias ou até os métodos experimentais de privação de sono induzem algum tipo de estresse e estão associados a enfraquecimento e *déficits* de memória, vários autores têm estudado o papel dos glicocorticóides no aprendizado e memória após privação de sono. Os resultados mais

recentes indicam que o enfraquecimento de memória relacionado à PSP não é consequente a variações nos níveis de glicocorticóides circulantes (Ruskin e col., 2006). De fato, a alteração nesses níveis é variável, com vários trabalhos não observando alterações, o que parece depender do método e tempo de privação usados (Tiba e col., 2007). Não se sabe, entretanto se existem alterações moleculares envolvendo a expressão de receptores para glico e mineralocorticóides no hipocampo.

Os RGc e RMn se encontram amplamente distribuídos no hipocampo e medeiam a ação dos hormônios corticosteróides. Ambos estão envolvidos no processo de memória e aprendizado e o desbalanço nas ações desses receptores está envolvido com o enfraquecimento do aprendizado e memória (Joels e col., 1995).

Neste trabalho avaliamos a expressão de RGc no hipocampo de animais PSP por um período de noventa e seis horas e avaliamos também o efeito da PSP, pelo mesmo período, na aquisição e consolidação da memória espacial. Nossos resultados mostram que animais PSP apresentam um aumento na expressão de RGc nas regiões CA1 e GD do hipocampo, regiões envolvidas na formação e consolidação de memória espacial, quando comparados ao grupo Controle, enquanto que na região CA3 não houve diferença significativa entre os grupos. Estes resultados podem indicar uma alteração no balanço existente entre receptores corticosteróides no hipocampo de ratos privados de sono paradoxal, que poderia ser responsável pelo enfraquecimento de memória associado à privação de sono. Alfarez e col. (2002) demonstraram que o aumento de RGc no hipocampo gera supressão da LTP e aumenta a LTD (depressão de longa duração). Como a LTP é importante no hipocampo para o processo de aquisição de memória, o aumento de RGc pode ser responsável por prejuízos no aprendizado e memória. Como o enfraquecimento de memória não parece ser consequente a alterações nos níveis circulantes de glicocorticóides (Ruskin e col., 2006), esta alteração pode ocorrer devido a alterações na expressão gênica induzidas pela PSP. Já é descrito na literatura a alteração na expressão de genes induzida pela PSP (Tufick e col., 2009). A avaliação da expressão de receptores para mineralocorticóides nestas regiões faz-se necessária para uma conclusão definitiva sobre como está o equilíbrio do sistema após o período de privação.

Com a finalidade de sugerirmos uma interação entre a alteração imunohistoquímica e um enfraquecimento no aprendizado e consolidação de memória espacial, testamos ratos controles e PSP no LAROB. Utilizamos 2 protocolos diferentes para estudarmos a influência da privação de sono prévia ao aprendizado e a influência da privação de sono na consolidação após o aprendizado.

Através da utilização do protocolo 1 observamos que a PSP por período de noventa e seis horas não interferiu no processo de aprendizado e memória, com ambos os grupos apresentando também uma queda gradual na latência de escape e número de erros nos 4 testes.

No protocolo 2 observamos que nos testes 1 e 2, pré privação, ambos os grupos apresentaram uma queda gradual na latência para localizar a plataforma com o passar das sessões. Após noventa e seis horas, o grupo PSP apresentou uma tendência a aumento no tempo de latência, que não foi estatisticamente significativa. Provavelmente o aumento no número de animais experimentais normalizará as variáveis associadas à avaliação comportamental. O mesmo foi observado na quantidade de erros obtidos na tentativa de achar a plataforma.

Em um trabalho recente, Hajali e col. (2012) demonstraram que a PSP por um período de 72 horas afeta a memória espacial de ratos Wistar de uma forma sexo dependente, afetando somente ratos Wistar fêmeas. Os resultados obtidos pelos pesquisadores, poderiam explicar os nossos resultados no efeito da privação pré aprendizado (protocolo 1), já que só utilizamos ratos machos. Contudo neste protocolo utilizamos apenas 6 ratos por grupo, o que pode ser pouco para uma avaliação comportamental. Pretendemos aumentar o número de animais experimentais para uma conclusão mais definitiva.

Nossos resultados demonstraram que a PSP gera aumento na expressão de RGc, no hipocampo, que é a região responsável pela aquisição de memória espacial e apresentam tendência a enfraquecimento na consolidação da memória de longo prazo.

CONCLUSÃO

Através dos dados obtidos nesse estudo podemos concluir que a PSP por período de 96 horas:

- a) Aumenta a expressão de receptores para glicocorticóides nas regiões CA1 e GD do hipocampo.
- b) Não altera a expressão de receptores para glicocorticóides na região CA3 do hipocampo.

REFERÊNCIAS

- Aguiar LC. Muscarinic acetylcholine neurotransmission enhances the late-phase of longterm potentiation in the hippocampal-prefrontal cortex pathway of rats in vivo: a possible involvement of monoaminergic systems. *Neurosci.* 2008; 153: 1309-1319.
- Albert I, Cicala GA, Siegel J. The behavioral effects of REM sleep deprivation in rats. *Psychopha.* 1970; 6: 550-560.
- Alfarez DN, Wiegert O, Joëls M, Krugers HJ. Corticosterone and stress reduce synaptic potentiation in mouse hippocampal slices with mild stimulation. *Neuroscience.* 2002; 115: 1119-1126.
- Alhaider IA, Aleisa AM, Tran TT, Alzoubi KH, Alkadhi KA. Chronic caffeine treatment prevents sleep deprivation-induced impairment of cognitive function and synaptic plasticity. *Sleep.* 2010; 33: 437-444.
- Almeida O, Conde G, Crochmore C, Demenieux B, Fischer D, Hassan A, Meyer M, Holsboer F, Michaelidis T. Shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J.* 2000; 14: 779-790.
- Andersen ML, Papale LA, Hipólido DC, Nobrega JN, Tufik S. Involvement of dopamine receptors in cocaine-induced genital reflexes after paradoxical sleep deprivation. *Behav. Brain Res.* 2005; 160: 44-50.
- Aschoff J. Circadian Rhythms: General features and endocrinological aspects. In: D. T. Krieger (Org), *endocrine rhythms* (1-29). Ed. Raven Press, New York. 1979.
- Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science.* 1953; 118: 273-274.
- Battaglia FP, Benchenane K, Sirota A, Pennartz CM, Wiener SI. The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends Cogn. Sci.* 2011; 15: 310-318.
- Bayer KU, De Koninck P, Leonard AS, Hell JW, Schulman H. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature.* 2001; 14: 801-805.
- Beason-Held LL, Rosene DL, Killiany RJ, Moss MB. Hippocampal formation lesions produce memory impairment in the rhesus monkey. *Hippo.* 1999; 9: 562-74.
- Born J, Wagner U. Sleep, hormones and memory *Obstet Gynecol Clin. Am.* 2009; 36: 809-829.
- Brink M, Humbel BM, De Kloet ER, Van Driel R. The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. *Endocrinol.* 1992; 130: 3575-3581.
- Chen W, Kushida CA. in: C.A. Kushida (Org), *Sleep deprivation - Basic science, physiology and behavior.* Ed Marcel Dekker, New York. 2005.

Clark RE, Zola SM, Squire LR. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J. Neurosci.* 2000; 1:8853-8860.

Claro FT, Silva RH, Frussa-Filho R. Bovine brain phosphatidylserine attenuates scopolamine induced amnesia. *Physiol. Behav.* 1999; 67: 551-554.

Cohem HL, Dement WC. Sleep: Changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after privation of paradoxical phase. *Science.* 1965; 150: 1318-1319.

Cortez CM, Silva D. Fisiologia do Comportamento e do Estresse. In: CORTEZ CM; SILVA D. Fisiologia aplicada à psicologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008; 230-248.

Damasceno F, Skinner GO, Fontanella J, Ferraz MR, Almeida OM. Sleep deprivation affects sexual behavior and tyrosine hydroxylase (TH) levels in sexually experienced male rats. *Physiol. Behav.* 2008; 94: 405-411.

Damasceno F, Skinner GO, Gomes A, Araujo PC, Almeida OMMS. Systemic amitriptyline administration does not prevent the increased thermal response induced by paradoxical sleep deprivation. *Pharmacol, Biochem. and Behav.* 2009; 94: 51-55.

Dash PK, Hebert AE, Runyan JD. A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res. Rev.* 2004; 45: 30-37.

De Gennaro L, Ferrara M. Sleep spindles: An overview. *Sleep Med Rev.* 2003; 7: 423-440.

De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Rev. Neuroscience.* 2005; 6: 463-475.

De Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* 1999; 22: 422-426.

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endo. Rev.* 1998; 19: 269-301.

De Kloet R, Oitzl MS, Joels M. Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1993; 13, 433-455.

Dement W, Kleitman N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation eye movement, body motility and dreaming. *Electroencephalogr. Clinical neurophysio.* 1957; 9: 673-690.

Diamond DM, Bennett MC, Fleshner M, Rose GM. Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippo.* 1992; 2: 421-30.

Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011; 11: 114-126.

Douma BR, Korte SM, Buwalda B, la Fleur SE, Bohus B, Luiten PG. Repeated blockade of mineralocorticoid receptors, but not of glucocorticoid receptors impairs food rewarded spatial learning. *Psychoneuroendocrinol.* 1998; 23: 33-44.

Ferraz MR, Ferraz MMD, Santos R. How REM sleep deprivation and amantadine affects male rat sexual behavior. *Pharmacol, Biochemis. and Behav.* 2001; 69: 325-332.

Fishbein W, Kastaniotis C, Chattman D. Paradoxical sleep: prolonged augmentation following learning. *Brain Res.* 1974; 11: 61-75.

Fishbein W, McGaugh JL, Swarz JR. Retrograde amnesia: Electroconvulsive shock effects after termination of rapid eye movement sleep deprivation. *Science.* 1971; 2: 80-82.

Foy MR, Stanton ME, Levine S, Thompson RF. Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. *J. Behav. Ther. Exp. Psychiatry.* 1987; 18: 179-183.

Garcia-Garcia FR, Drucker-Colin. Endogenous and exogenous factors on sleep-wake cycle regulation. *Prog. NeuroBiol.* 1999; 58: 297-314.

Goichot B, Weibel L, Chapotot F, Gronfier C, Piquard F, Brandenberger G. Effect of the shift of the sleep/wake cycle on three robust endocrine markers of the circadian clock. *Am. J Physiol.* 1998; 275: 243-248.

Graves LA, Heller EA, Pack AI, Abel T. Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learn Mem.* 2003; 10: 168-176.

Guzman-Marin R, Ying Z, Suntsova N, Methippara M, Bashir T, Szymusiak R, Gomez-Pinilla F, McGinty D. Suppression of hippocampal plasticity-related gene expression by sleep deprivation in rats. *J. Physiol.* 2006; 15: 807-819.

Hajali V, Sheibani V, Esmaeili-Mahani S, Shabani M. Female rats are more susceptible to the deleterious effects of paradoxical sleep deprivation on cognitive performance. *Behav. Brain Res.* 2012; 17: 311-318.

Hassan A, von Rosenstiel P, Patchev V, Holsboer F, Almeida O. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp. Neurol.* 1996; 140: 43-52.

Hennevin E, Leconte P. Study of the relations between paradoxical sleep and learning processes. *Physiol. Behav.* 1977; 18: 307-319.

Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, De Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR. Do corticosteroids damage the brain? *J. Neuroendocrinol.* 2006; 18: 393-411.

Herman JP, Patel PD, Akil H, Watson SJ. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Mol. Endocrinol.* 1989; 3: 1886-1894.

Hess RJR, Akert K, Koella WP. Sleep produced by electrical stimulation of the Thalamus. *Am. J Physiol.* 1952; 168: 260-267.

Hipólido DC, Moreira KM, Barlow KB, Wilson AA, Nobrega JN, Tufik S. Distinct effects of sleep deprivation on binding to norepinephrine and serotonin transporters in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005; 29: 297-303.

Hipólido DC, Suchecki D, Pimentel de Carvalho Pinto A, Chiconelli Faria E, Tufik S, Luz J. Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *J Neuroendocrinol*. 2006; 18: 231-238.

Hipólido DC, Tufik S, Raymond R, Nobrega JN. Heterogeneous effects of rapid eye movement sleep deprivation on binding to alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes in rat brain. *Neurosci*. 1998; 86: 977-87.

Hobson JA. Sleep and dreaming. In: Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire, LR. *Fundamental neuroscience*. Academic Press, New York. 1999.

Hoffman KL, Battaglia FP, Harris K. The upshot of up states in the neocortex: from slow oscillations to memory formation. *J. Neurosci*. 2007; 27: 11838-11841.

Ikeda M, Ikeda-Sagara M, Okada T, Clement P, Urade Y, Nagai T, Sugiyama T, Yoshioka T, Honda K, Inoué S. Brain oxidation is an initial process in sleep induction. *Neurosci*. 2005; 130: 1029-1040

Joels M, Heslen W, de Kloet ER. Long-term control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 1995; 53: 315-323.

Joels M, Karst H, Alfarez D, Heine VM, Qin Y, van Riel E, Verkuyl M, Lucassen PJ, Krugers HJ. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress*. 2004; 7: 221-231.

Joels M. Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur. J. Pharmacol*. 2008; 583: 312-321.

Jouvet D, Vimont P, Delorme F, Jouvet M. Étude de la privation sélective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. *Compt. Rend. Soc. Biol*. 1964 ; 158: 756-759.

Jouvet M. Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep. *Arch. Ital. Biol*. 1962; 100: 125-206.

Kim JJ, Haller J. Glucocorticoid hyper- and hypofunction: stress effects on cognition and aggression. *Ann. NY Acad. Sci*. 2007; 1113: 291-303.

Koehl M, Abrous DN. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Euro J. of Neurosci*. 2011; 33: 1101-1114.

Korte SM. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology *Neurosci. Bio. Behav. Rev*. 2001; 25: 117-142

Kryger M, Roth T, Dement W. *Principles and practice of sleep medicine*. 4th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2000.

Lai M, Horsburgh K, Bae SE, Carter RN, Stenvers DJ, Fowler JH, Yau JL, Gomez-Sanchez CE, Holmes MC, Kenyon CJ, Seckl JR, Macleod MR. Forebrain mineralocorticoid receptor overexpression enhances memory, reduces anxiety and attenuates neuronal loss in cerebral ischaemia. *Eur. J. Neurosci.* 2007; 25: 1832-1842.

Li HB, Jackson MF, Yang K, Trepanier C, Salter MW, Orser BA, Macdonald JF. Plasticity of synaptic GluN receptors is required for the Src-dependent induction of long-term potentiation at CA3-CA1 synapses. *Hippo.* 2011; 21: 1053-1061.

Linden ER, Bern D, Fishbein W. Retrograde amnesia: prolonging the fixation phase of memory consolidation by paradoxical sleep deprivation. *Physiol. Behav.* 1975; 14: 409-412.

Luine V, Spencer RL, McEwen BS. Effects of chronic corticosterone ingestion on spatial memory performance and hippocampal serotonergic function. *Brain Res.* 1993; 9: 65-70.

Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS. Stress-dependent impairments of spatial memory. Role of 5-HT. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994; 30: 403-404.

Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn.* 2007; 65: 209-237.

Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 2004; 84: 87-136.

Machado RB, Hipólido DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. (2004) Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: Quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res.* 2004; 1004: 45-51.

Malenka RC, Bear MF. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 2004; 44: 5-21.

Malenka RC. The long-term potential of LTP. *Nat. Rev.* 2003; 4: 923-926.

Manns JR, Hopkins RO, Squire LR. Semantic memory and the human hippocampus. *Neuron.* 2003; 10: 127-133.

McCoy JG, Strecker RE. The cognitive cost of sleep lost. *Neurobiol. Learn Mem.* 2011; 96: 564-582.

McDermott CM, LaHoste GJ, Chen C, Musto A, Bazan NG, Magee JC. Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 2003; 22: 9687-95.

McEwen BS, Sapolsky RM. Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1995; 5: 205-216.

Moser EI, Kropff E, Moser MB. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Ann. Rev. Neurosci.* 2008; 31: 69-89.

Munck A, Mendel DB, Smith LI, Orti E. Glucocorticoid receptors and actions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 141: 2-10

Norman WM, Hayward LF. in: Carney Pr; Berry Rb, Geyer Jd (Org), *Clinical sleep disorders*. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, New York. 2005

O'Keefe JE; Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Oxford University Press, 1978; 570.

Oitzl MS, Van Haarst AD, De Kloet ER. Behavioral and neuroendocrine responses controlled by the concerted action of central mineralocorticoid (MRS) and glucocorticoid receptors (GRS). *Psychoneuro.* 1997; 22: 87-93.

Pal D, Mallick BN. Neural mechanism of rapid eye movement sleep generation with reference to REM-OFF neurons in locus coeruleus. *Indian J. Med. Res.* 2007; 125: 721-739.

Palma BD, Tiba PA, Machado RB, Tufik S, Suchecki D. Immune outcomes of sleep disorders: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a modulatory factor. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2007; 29: 33-8.

Patti CL, Kameda SR, Carvalho RC, Takatsu-Coleman AL, Lopez GB, Niigaki ST, Abílio VC, Frussa-Filho R, Silva RH. Effects of morphine on the plus-maze discriminative avoidance task: role of state-dependent learning. *Psychopharmacol.* 2006; 184: 1-12.

Pavlidis C, Watanabe Y, Magariños AM, McEwen BS. Opposing roles of type I and type II adrenal steroid receptors in hippocampal long-term potentiation. *Neurosci.* 1995; 68: 387-394.

Philip P, Åkerstedt T. Transport and industrial safety, how are they affected by sleepiness and sleep restriction? *Sleep Med. Rev.* 2006; 10: 347-356.

Plihal W, Born J. Effects of early and late nocturnal sleep on priming and spatial memory. *Psychophysiol.* 1999; 36: 571-582.

Pryce C. Postnatal ontogeny of expression of the corticosteroid receptor genes in mammalian brains: Inter-species and intra-species differences. *Brain Res. Rev.* 2008; 57: 596-605.

Rauchs G, Desgranges B, Foret J. The relationships between memory systems and sleep stages. *J. Sleep Res.* 2005; 14: 123-140.

Rauchs G, Feyers D, Landeau B, Bastin C, Luxen A, Maquet P, Collette F. Sleep contributes to the strengthening of some memories over others, depending on hippocampal activity at learning. *J. Neurosci.* 2011; 31: 2563-2568.

Ravassard P, Pachoud B, Comte JC, Mejia-Perez C, Scoté-Blachon C, Gay N, Claustrat B, Touret M, Luppi PH, Salin PA. Paradoxical (REM) sleep deprivation causes a large and rapidly reversible decrease in long-term potentiation, synaptic transmission, glutamate receptor protein levels, and ERK/MAPK activation in the dorsal hippocampus. *Sleep.* 2009; 32: 227-40.

Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA. Sleep deprivation in the rat: x. Integration and discussion of the findings. *Sleep.* 1989; 12: 68- 87.

Rechtschaffen A, Bergmann BM. Sleep deprivation in rats: an updates of the 1989 paper. *Sleep*. 2002; 1: 18-24.

Rechtschaffen A, Siegel J. Sleep and dreaming. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. (Eds). *Principles of neural science*. 4th ed., McGraw-hill, New York. 2000.

Reinoso-Suarez F, De Andres I, Rodrigo-Ângulo ML, Garzon M. Brain strutures and mechanisms involved in the generetion of REM sleep. *Sleep Med. Rev.* 2001; 5: 63-77.

Rogalska. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in hippocampus: their impact on neurons survival and behavioral impairment after neonatal brain injury. *Vitam. and Horm.* 2010; 82: 392-419.

Rubinson K, Lang EJ. O sistema nervoso. In: Berne, Levy. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009; 553-699.

Sandi C, Pinelo-Nava MT. Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast.* 2007; 2007: 78970.

Sapolsky R. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2000; 57: 925-930.

Shneerson JM. *Handbook of sleep medicine*. Oxford: Blackwell Science, 2000; 237.

Shors TJ. Significant life events and the shape of memories to come: a hypothesis. *Neurobiol. Learn Mem.* 2006; 85: 103-115.

Siegel JM. The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science.* 2001; 2:1058-1063.

Siegel, JM. Sleep viewed as a state of adaptive inactivity. *Nature Rev. Neurosci.* 2009; 10: 747-753.

Silva RH, Chehin AB, Kameda SR, Takatsu-Coleman AL, Abílio VC, Tufik S, Frussa-Filho R. Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animal models of learning and memory in mice. *Neurobiol. Learn Mem.* 2004; 82: 90-98.

Skinner GO, Damasceno F, Gomes A, de Almeida OM. Increased pain perception and attenuated opioid antinociception in paradoxical sleep-deprived rats are associated with reduced tyrosine hydroxylase staining in the periaqueductal gray matter and are reversed by L-DOPA. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2011; 99: 94-99.

Sloan MA. The effect of deprivation of rapid eye movement (REM) sleep on male learning and aggression in the albino rat. *J. Psychiat. Res.* 1972; 9: 101-111.

Sousa N, Cerqueira J, Almeida O. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. *Brain Res. Rev.* 2008; 57: 561-570.

Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet.* 1999; 2: 1435-1439.

Stickgold R, James L, Hobson JA. Visual discrimination learning requires sleep after training. *Nat Neurosci.* 2000; 3: 1237-1238.

Sweatt JD. Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learn Mem.* 1999; 5: 399-416.

Tadavarty R, Rajput PS, Wong JM, Kumar U, Sastry BR. Sleep-deprivation induces changes in GABA(B) and mGlu receptor expression and has consequences for synaptic long-term depression. *PLoS One.* 2011; 6: 24933.

Thompson AM, Gosnell BA, Wagner JJ. Enhancement of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine exposure. *Neuropharmacol.* 2002; 42: 1039-1042.

Tiba PA, Oliveira MG, Rossi VC, Tufik S, Suchecki D. Glucocorticoids are not responsible for paradoxical sleep deprivation-induced memory impairments. *Physiol. Behav.* 2008; 27: 444-452.

Tobler I. Effect of forced locomotion on the rest-activity cycle of the cockroach. *Behav. Brain Res.* 1983; 8: 351-360.

Tole S, Christian C, Grove EA. Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus. *Develop.* 1997; 124: 4959-4970.

Tufik S, Lindsey CJ, Carlini EA. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacol.* 1978; 16: 98-105.

Van Eekelen JAM, Jiang W, De Kloet ER, Bohn MC. Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J Neurosci. Res.* 1988; 21: 88-94.

Vecsey CG, Baillie GS, Jaganath D, Havekes R, Daniels A, Wimmer M, Huang T, Brown KM, Li XY, Descalzi G, Kim SS, Chen T, Shang YZ, Zhuo M, Houslay MD, Abel T. Sleep deprivation impairs cAMP signalling in the hippocampus. *Nature.* 2009; 22: 1122-1125.

Wagner U, Born J. Memory consolidation during sleep: Interactive effects of sleep stages and HPA regulation. *Stress.* 2008; 11: 28-41.

Wolf OT. HPA axis and memory. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 17: 287-99

Wright RL, Lightner EN, Harman JS, Meijer OC, Conrad CD. Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 2006; 24: 595-605

Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature.* 1997; 29: 497-500.

Zimmerman JE, Naidoo N, Raizen DM, Pack AI. Conservation of sleep: insights from non-mammalian model systems. *Trends Neurosci.* 2008; 31: 371-376.