

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOMEDICINA

SAMANTHA DE FREITAS CAVALCANTE

**ANÁLISE DA AÇÃO FARMACOLÓGICA DO HALOPERIDOL SOBRE O
SISTEMA DOPAMINÉRGICO E SUA INFLUÊNCIA NA ARQUITETURA DO
SONO.**

Natal

Setembro 2021

ANÁLISE DA AÇÃO FARMACOLÓGICA DO HALOPERIDOL SOBRE O SISTEMA
DOPAMINÉRGICO E SUA INFLUÊNCIA NA ARQUITETURA DO SONO.

por

Samantha de Freitas Cavalcante

Monografia Apresentada à
Coordenação do Curso de
Biomedicina da Universidade Federal
do Rio Grande do Norte, como
Requisito Parcial à Obtenção do Título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Professor Doutor Bruno Lobão Soares

Natal

Setembro 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOMEDICINA

A Monografia ANÁLISE DA AÇÃO FARMACOLÓGICA DO HALOPERIDOL SOBRE O SISTEMA DOPAMINÉRGICO E SUA INFLUÊNCIA NA ARQUITETURA DO SONO.

elaborada por SAMANTHA DE FREITAS CAVALCANTE

e aprovada por todos os membros da Banca examinadora foi aceita pelo Curso de Biomedicina e homologada pelos membros da banca, como requisito parcial à obtenção do título de

BACHAREL EM BIOMEDICINA

Natal, 13 de setembro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Gustavo dos Santos Lima Zampier – Escola de Ciência e Tecnologia

Gilberto Corso – Departamento de Biofísica – Centro de Biociências

ÍNDICE

	Página
1-RESUMO	8
2- INTRODUÇÃO	9
2.1 – SONO	9
2.2 – ESTAGIAMENTO DO SONO	11
2.3 – CRONOBIOLOGIA	13
2.4 - CENTROS GERADORES DO SONO	15
2.5 - DOPAMINA E SISTEMA DOPAMINÉRGICO	16
2.6 - DOPAMINA E SUA REGULAÇÃO DO CICLO SONO-VIGÍLIA	18
2.7- HALOPERIDOL	19
2.8- HALOPERIDOL E EFEITOS SOBRE CICLO SONO-VIGÍLIA	21
3 – OBJETIVOS	23
4 – METODOLOGIA	24
4.1 – ANIMAIS	24
4.2 - TESTE PARA PREFERÊNCIA DE NOVOS OBJETOS	24
4.3 TESTE DE EXPOSIÇÃO ÚNICO	25

4.4	IMUNOHISTOQUÍMICA	25
4.5	INJEÇÕES DO GRUPO VEÍCULO E HALOPERIDOL	25
4.6	REGISTROS DO CICLO SONO-VIGÍLIA	25
4.7	ANÁLISE DOS MAPAS DE ESTADO.	26
4.8	ANÁLISE QUANTITATIVA DOS EPISÓDIOS.	27
4.9	ANÁLISE QUALITATIVA DA DURAÇÃO DE CADA ESTÁGIO DO CICLO SONO-VIGÍLIA.	28
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5	RESULTADOS	29
5.1	RESULTADOS DOS EPISÓDIOS NOS INTERVALOS DE VIGÍLIA	29
5.2	RESULTADOS DOS EPISÓDIOS NOS INTERVALOS DE SONO DE ONDAS LENTAS (SWS)	29
5.3	RESULTADOS DOS EPISÓDIOS NOS INTERVALOS DE SONO REM	30
5.4	RESULTADO DO TEMPO DESPENDIDO (DURAÇÃO) EM VIGÍLIA	31
5.5	RESULTADO DO TEMPO DESPENDIDO (DURAÇÃO) EM SONO DE ONDAS LENTAS (SWS)	31
5.6	RESULTADO DO TEMPO DESPENDIDO (DURAÇÃO) EM SONO REM	32
6	DISCUSSÃO	33

7 - CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1.0 RESUMO

A dopamina é um neurotransmissor envolvido nos processos de geração de emoção e movimentos complexos. A alteração da transmissão sináptica dopaminérgica tem sido implicada como um dos fatores de piora clínica em casos psiquiátricos e neurológicos como Parkinson, esquizofrenia e desordem de hiperatividade e déficit de atenção. Indivíduos com essas condições tendem a demonstrar distúrbios de sono caracterizados por sonolência diurna excessiva, distúrbios do comportamento e latência diminuída do sono REM, assim como alterações na arquitetura geral do sono. Diante disso, o objetivo do presente estudo se encontra em verificar a ação de uma droga moduladora do sistema dopaminérgico, o haloperidol, na distribuição das fases do sono tardio em REM e de ondas lentas ao longo de 4 horas de registros eletrofisiológicos em camundongos. Para análise da identificação e estagiamento do sono foram utilizados mapas bidimensionais de estados (state-map) associados à eletromiografia. Posteriormente, para cada hora foram feitas análises estatísticas comparando a quantidade e duração de episódios de sono (REM e NREM) e vigília entre os grupos salina e haloperidol. Por conseguinte, nossos resultados mostram que o grupo haloperidol apresentou menor percentual de REM durante sono tardio. Por fim, mais estudos se fazem necessários para entender como moduladores do sistema dopaminérgico, especialmente o haloperidol, podem atuar como contributos participativos no déficit cognitivo de pacientes que fazem o uso farmacológico dessa medicação.

Dopamine is a neurotransmitter involved in the processes of emotion generation and complex movements. The alteration of dopaminergic synaptic transmission has been implicated as one of the clinical worsening factors in psychiatric and neurological cases such as Parkinson's, schizophrenia and attention deficit and hyperactivity disorder. Individuals with these conditions tend to demonstrate sleep disturbances characterized by excessive daytime sleepiness, behavioral disturbances, and decreased REM sleep latency, as well as changes in general sleep architecture. Therefore, the aim of the present study is to verify the action of a drug that modulates the dopaminergic system, haloperidol, in the distribution of late sleep phases in REM and slow waves over 4 hours of electrophysiological recordings in mice. To analyze the identification and staging of

sleep, two-dimensional state maps (state-map) associated with electromyography were used. Subsequently, for each hour, statistical analyzes were performed comparing the number and duration of sleep episodes (REM and NREM) and wakefulness between the saline and haloperidol groups. Therefore, our results show that the haloperidol group had a lower percentage of REM during late sleep. Finally, further studies are needed to understand how modulators of the dopaminergic system, especially haloperidol, can act as participatory contributions in the cognitive deficit of patients who use this medication pharmacologically.

2.0 INTRODUÇÃO

2.1 SONO

Todos nós dormimos e estamos familiarizados com esse fenômeno desde que nascemos. Entretanto, chegar a um consenso quanto à definição exata sobre o que é dormir, constitui uma tarefa difícil, sobretudo na neurociência. Isso porque o sono bem como a sua necessidade não é homogêneo para todos os animais(SIEGEL, 2008). De modo geral, dormir pode ser definido como um estado diminuído de respostas sensoriais e imobilidade muscular, que acontece periodicamente sendo regido por um ciclo circadiano, cuja privação tende a resultar em mecanismos de rebote (SIEGEL, 2008).

Mas será que o sono é igual para todos os animais? Quando falamos de mamíferos, dois tipos de sono são preponderantes: sono Não-Rem (sono de ondas lentas) e sono REM. A nível neuronal, o sono não-REM é caracterizado por uma intensa redução na atividade do tronco cerebral (SIEGEL, 1990). No prosencéfalo, a atividade neuronal diminui durante a vigília tranquila com predominância de padrões irregulares de disparos neurais. Não obstante, a presença de ondas lentas de alta voltagem e de fusos de sono aparecem a nível de neocórtex, com mínima liberação de acetilcolina (LAPIERRE et al., 2007).

Em contraste ao sono não-REM, o sono REM em mamíferos é caracterizado por um padrão de atividade elétrica similar aos estados de vigília na maior parte das regiões encefálicas. Neurônios do tronco cerebral estão em geral, bem ativos durante essa fase, assim como neurônios corticais que quando ativos durante o sono REM exibem um padrão eletroencefalográfico muito próximo do padrão da vigília (SIEGEL, 1990).

Dessa forma, podemos fazer a pergunta: será que o sono evoluiu de modo distinto para cada gênero animal diferente? Será que a falta de sono interfere na cognição desses bichos? Um levantamento da literatura acerca do tema revela que a evolução foi capaz de produzir espécies que possuem estados de vigília tranquila como um substituto para o sono (SIEGEL, 2008). A exemplo disso, em anfíbios, especificamente na rã-touro *Rana catesbeiana* uma espécie de ciclo diurno, mostrou níveis de responsividade variante ao longo do ciclo circadiano. Em períodos de maior inatividade, o grau de responsividade a pequenos estímulos era maior do que períodos em que esse animal estaria sob estado de vigília (ALLAN HOBSON, 1967). Acredita-se que isso aconteça devido à maior vulnerabilidade à predação desses animais que descansam sem diminuir graus de vigilância em relação ao ambiente (ALLAN HOBSON, 1967)

Não obstante, nas tartarugas *Terrapene carolina* ocorre uma quiescência comportamental acompanhada de uma redução de 29% no grau de responsividade à estímulos ambientais cuja latência de resposta leva 0,44 segundos a mais para acontecer. Além disso, os correlatos eletroencefalográficos tendem a aumentar durante a interrupção desse comportamento quiescente (FLANIGAN et al., 1974). Alguns estudos buscaram definir o padrão de sono REM através do registro neuronal dessas tartarugas. Eles observaram que não houve ativação do tronco cerebral durante os estados quiescentes como observado no sono REM (EILAND; LYAMIN; SIEGEL, 2001). Ao contrário, acharam uma redução geral e acentuada na atividade neuronal imediatamente após o fim da vigília, com poucos picos entre 30ms-80ms relatados ao EEG, observados apenas em estados de repouso, embora nenhuma onda lenta tenha sido de fato encontrada nos registros de EEG do prosencéfalo (SIEGEL, 2008).

Logo, se faz necessário um estudo mais detalhado acerca desse fenômeno, o sono, tão distinto e amplamente distribuído ao longo dos diferentes gêneros e espécies.

2.2 ESTAGIAMENTO DO SONO.

O ciclo normal de sono e vigília acontece à medida que diferentes sistemas neurais são ativados ou desativados. Em 1953, Nathaniel Kleitman e Eugene Aserinsky mostraram mediante registros Eletroencefalográficos de indivíduos normais que o sono é, na verdade alternância de diferentes estágios que acontecem em uma sequência específica. A caracterização dos estágios de sono é medida, principalmente, através do eletroencefalograma, eletrooculograma e eletromiograma (Fernandes RMF, 2006).

Nos seres humanos, sucessivos estágios de sono acontecem dentro da primeira hora acompanhados de uma espécie de letargia. A partir desse momento o espectro de frequências obtido pelo EEG desvia para valores mais baixos, aumentando ligeiramente a amplitude das ondas corticais. A esse período de sonolência inicial, dá-se o nome de estágio I do sono. Posteriormente, o II estágio, caracteriza-se por um decréscimo adicional na frequência das ondas do EEG, aumento da amplitude e a presença de algumas oscilações de alta frequência, os chamados fusos do sono (descargas periódicas que acontecem entre 12-14Hz), resultado das interações entre neurônios talâmicos e corticais (PURVES et al., 2004).

No III estágio do sono, caracterizado como sono profundo, o número de fusos tende a diminuir juntamente com frequência do componente principal das ondas do traçado do EEG, concomitantemente com o aumento ainda mais pronunciado da amplitude do sinal. Ademais, o nível mais profundo, o estágio IV mais conhecido como sono de ondas lentas, caracteriza-se pela presença de oscilações de muita baixa frequência (0,5-2Hz) e alta amplitude, chamada de ondas delta possivelmente fruto da atividade elétrica de neurônios corticais. Do estado mais superficial ao mais profundo, leva-se em torno de 1 hora. Juntos, a esses 4 estágios chamamos de sono Não-REM (PURVES et al., 2004).

Em condições homeostáticas, após um período habitual de sono profundo, um estágio bem diferente, composto por movimentos oculares rápidos, denominado de sono REM aparece. O sono REM ou sono paradoxal, é assim chamado pela presença de atonia muscular e um padrão oscilatório similar às ondas da vigília observados no EEG (PURVES et al., 2004). Outro aparente paradoxo é que, mesmo essa atonia muscular presente e bem caracterizada, movimentos corporais fásicos e erráticos podem ser observados em diferentes grupos musculares, principalmente face e membros, bem como emissão de ruídos sonoros (Fernandes RMF, 2006).

Ao eletroencefalograma, são observadas ondas em aspecto serrilhado, cuja atividade rítmica ocorre na faixa Delta a Teta consistindo uma assinatura gráfica do sono REM (PURVES et al., 2004). Outros comportamentos característicos são: movimentos rápidos dos olhos observados ao EOG, irregularidades de padrão respiratório, possivelmente acompanhados de bradipneia episódica, taquipneia e pausas centrais em períodos de tempo inferiores a 10 segundos (PURVES et al., 2004). Irregularidades fisiológicas na frequência cardíaca podem acompanhar variabilidade respiratória no sono REM (PURVES et al., 2004). Ademais, essa é uma fase essencialmente caracterizada pela presença de sonhos, manifestações de conteúdos emocionais e sinestésicos cujo enredo sequencial é possível de ser lembrado e, a ativação autonômica pela intensidade de seu conteúdo pode reverberar para emissão de sons e falas (Fernandes RMF, 2006).

Nesse sentido, após cerca de 10 minutos em sono REM, o encéfalo estabelece um ciclo de volta ao sono não REM. Assim, o sono de ondas lentas repete-se uma vez mais, no segundo período desse ciclo contínuo, ocorrendo em uma noite apenas dois estágios de sono não REM. Em média, durante uma noite acontecem 4 episódios de sono REM, com durações cada vez maiores (PURVES et al., 2004).

Entretanto, a distribuição desses estágios de sono não é igual para todos os animais. Por exemplo, nos mamíferos terrestres (que somam mais de 4000 espécies com diferenças intraespecíficas) os camundongos, possuem um ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, cujo período de maior atividade é o noturno. Seu sono é dividido em sono REM, NREM assim como nos humanos, cuja alternância entre os

ciclos é polifásica (YAMABE et al., 2019), ou seja, os ciclos de sono acontecem várias vezes ao longo de um dia.

Não obstante, em mamíferos marinhos o sono pode acontecer em apenas um hemisfério cerebral por vez (SIEGEL, 2008). Em otariídeos, como os leões, lobos marinhos e focas, o sono diverge durante os períodos terrestres e aquáticos. Em terra, o sono em focas tem o EEG sincronizado bilateralmente e o animal fecha os dois olhos alternando entre fases de sono REM e NREM. Entretanto, em ambientes aquáticos, o sono apresenta-se sob um padrão de comportamento assimétrico, com uma das nadadeiras ativas para manutenção da posição corporal enquanto a outra está inativa. A foca então pode apresentar ondas lentas em um hemisfério com o olho contralateral fechado enquanto que o outro olho permanece parcialmente aberto criando assim, um perfil de sono paradoxal em que metade do cérebro e do corpo se encontram “adormecidos” e a outra metade “acordada” (SIEGEL, 2008).

Em paralelo, em golfinhos e outros cetáceos, como a baleia beluga, a situação é um pouco diferente. Esses animais apresentam o sono sob a forma de ondas lentas uni-hemisféricas, não apresentando ondas de alta voltagem bilateralmente (STAFNE; MANGER, 2004). Nesse sentido, algumas vezes eles nadam e flutuam na superfície sob a presença dessas ondas lentas. Todavia, o que diferencia esse grupo de animais dos otariídeos é que eles não apresentam assimetria na sua atividade motora, ao contrário do comportamento observado nas focas (STAFNE; MANGER, 2004).

2.3 CRONOBIOLOGIA

Entender a manutenção do ciclo de sono-vigília por uma perspectiva neuroendócrina e neuroquímica é compreender como o corpo humano é capaz de adequar o seu bioritmo aos ciclos de claro-escuro guiados por elementos externos e internos que interagem como indicadores. Dessa forma, a luz do sol e o calor do dia, a escuridão da noite, as marcações dos relógios, o barulho dos carros da cidade e de animais como galos e pássaros compõem uma conjuntura de elementos condicionantes à organização temporal de atividades biológicas as quais criam rotinas e padrões de ciclos circadianos.

Endogenamente, ciclos complexos de secreção hormonal, neurotransmissores bem como alguns centros encefálicos associam-se aos marcadores externos permitindo uma variação do biorritmo natural entre repouso e atividade no ciclo circadiano (PURVES et al., 2004). Um dos centros encefálicos importantes para esse processo é o núcleo supra-óptico, localizado no hipotálamo anterior. Este, recebe impulsos luminosos carregados pelo nervo óptico sendo a luz um dos marcadores externos que regulam as funções endócrinas desse sistema. Além disso, a luminosidade modula o funcionamento da glândula pineal, responsável pela secreção de melatonina, a qual em sua instância tem a funcionalidade de induzir e indicar o preparo do sistema para uma noite de sono (PURVES et al., 2004).

Não obstante, a sua secreção tende a seguir um padrão programado, sob influência da luz ambiental cujo pico ocorre nas primeiras horas da noite considerado o portão de entrada para o sono. Embora a melatonina não seja o único neuro-hormônio a participar desse processo, o prejuízo na sua produção e secreção tende a atrasar o ciclo circadiano e, conseqüentemente gerar dificuldade em iniciar estados de sonolência (PURVES et al., 2004). Ademais, outros hormônios, como o do crescimento e a testosterona, têm seu pico de secreção durante o sono NREM de ondas lentas. Por essa razão, a fragmentação do sono em crianças pode levar a um déficit significativo no desenvolvimento estatural (FERNANDES, 2006).

Outros mecanismos endógenos sincronizadores do ciclo sono-vigília, partem do aumento dos hormônios tireoidiano, cortisol e insulina, nas primeiras horas da manhã, cuja função é dar início à vigília seja por aumento da taxa metabólica, pelo aumento da glicemia ou pela utilização da glicose pelas células. Nesse sentido, certos neurotransmissores são importantes para a vigília como substância P, fator de liberação de corticotrofina (CRF), fator de liberação de tireotrofina (TRF) e o peptídeo intestinal vasoativo. Por outro lado, neurotransmissores indutores de sono são hipocretina, orexina, beta-endorfina, encefalina e prostaglandina D2 (FERNANDES, 2006).

No somatório dos mecanismos endógenos, a variação da temperatura corporal interna obtém destaque cuja variação soma 0,5° ao longo das 24 horas. Logo nas

primeiras horas da manhã, a curva da temperatura corporal passa a subir, facilitando o estágio de vigília, obtendo pico ao final da tarde, por volta das 16h-18h. Ao início da noite, ela passa a decair chegando ao nível mais baixo durante a madrugada, facilitando a ocorrência de sono REM (PURVES et al., 2004). A cronobiologia da temperatura corporal é um dos fatores que influenciam o prejuízo de sono durante o *jet lag* - termo cunhado para designar distúrbios temporários de sono que viajantes podem sentir quando cruzam para fusos horários muito distintos. Isso acontece porque a modulação da temperatura corporal não está diretamente relacionada à luminosidade, mas a uma adaptação rítmica e temporal da rotina do indivíduo (FERNANDES, 2006).

2.4 CENTROS GERADORES DO SONO

O fenômeno de sono e vigília ocorre por uma série de interações excitatórias e inibitórias em diferentes circuitos neurais. Em 1949, Horace Magoun e Giuseppe Moruzzi descobriram, por meio da estimulação elétrica de um grupo de neurônios colinérgicos próximos à junções entre ponte e mesencéfalo, que essa região determinava um estado de vigília e alerta (PURVES et al., 2004). A essa região do tronco encefálico foi nomeada posteriormente de sistema ativador reticular, dando a entender que o estado de vigília e alerta requer circuitos de ativação especiais, que não dependem única e exclusivamente do estímulo sensorial externo. Na mesma época, Walter Hess que a estimulação do tálamo com pulsos de baixa frequência em gatos despertos eram capazes de produzir sono de ondas lentas. A junção desses experimentos foi então capaz de mostrar que o sono envolve uma interação de padrões entre tálamo e córtex (PURVES et al., 2004).

Em relação ao sono REM, hoje se sabe que seus movimentos oculares rápidos surgem porque na ausência de um estímulo externo, sinais são gerados de forma endógena pela formação reticular pontina transmitidos à região motora do colículo superior. Esses neurônios coliculares, por sua vez, se projetam para Formação Reticular Paramedialpontina (FRPP) e para o núcleo intersticial rostral coordenando a precisão temporal e a direção dos movimentos oculares (PURVES et al., 2004).

O sono REM tem sua origem na formação reticular pontina que emite oscilações ao córtex occipital através do núcleo geniculado lateral do tálamo. Essas

ondas geniculo-pontino-occipitais, servem como bons marcadores para entender a entrada do sono REM no eletroencefalograma (PURVES et al., 2004).

Segundo Hobson et al 1989, através de imageamento por ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons, a fim de comparar a atividade encefálica na vigília e no sono REM, observou que as atividades da amígdala, parahipocampo, tegmento pontino e córtex cingulado anterior aumentam no REM, enquanto que as atividades do córtices pré-frontal dorsolateral e cingulado posterior diminuem (PURVES et al., 2004).

Não obstante, um dos componentes chave para ativação do sistema ativador reticular são os núcleos colinérgicos próximos à junção ponte-mesencéfalo cujas projeções vão para os neurônios tálamo-corticais. Nesse sentido, os neurônios desses núcleos produzem altas taxas de despolarização durante a vigília e no sono REM, causando uma dessincronização observada no EEG (um desvio de ondas de alta amplitude, sincronizadas, para ondas de baixa amplitude e alta frequência, dessincronizadas) sugerindo que a atividade dos núcleos colinérgicos no sistema ativador reticular é uma das principais causas para os estados de vigília e sono REM, cuja quiescência é associada aos estados de sono profundo de ondas lentas (PURVES et al., 2004).

Todavia, a atividade de neurônios colinérgicos não é a única responsável por esses estados. Neurônios adrenérgicos do locus coeruleus, neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe e histaminérgicos do núcleo túberomamilar (NTM) do hipotálamo participam através de uma ativação simultânea de redes colinérgicas, monoaminérgicas e histaminérgicas para os estados de vigília. A inibição periódica desses três circuitos, acontece por neurônios do núcleo préoptico ventrolateral (POVL) do hipotálamo. Acredita-se que a ativação desses neurônios contribua para o início do sono. Já no sono REM, as monoaminas e serotonina sofrem diminuição da sua influência, enquanto há o aumento dos níveis colinérgicos (PURVES et al., 2004).

2.5 DOPAMINA E SISTEMA DOPAMINÉRGICO

A dopamina é um neurotransmissor produzido por neurônios do tronco cerebral, substância nigra e área tegumentar ventral, que em conjunto formam os núcleos de projeção difusa que compõe o sistema dopaminérgico (COLEBROOKE et al., 2006). Nesse sentido, as projeções da substância nigra ao núcleo estriado associam-se às funções de planejamento e execução de movimentos motores simples e sua porção ventral está associada à recompensa social (COLEBROOKE et al., 2006). Em relação à área tegumentar ventral, seus axônios projetam-se ao sistema límbico e lobo frontal cujas vias relacionam-se ao processamento emocional e tomada de decisão (COLEBROOKE et al., 2006).

Em relação à sua estrutura bioquímica, a dopamina é classificada como uma catecolamina cujo aminoácido tirosina é seu precursor. A tirosina recebe um grupamento hidroxila através da ação da enzima tirosina hidroxilase originando DOPA. Em sequência, a DOPA perde um grupamento carboxila por meio da atuação da DOPA descarboxilase originando, assim, o neurotransmissor dopamina também possível precursor de noradrenalina e adrenalina (DALE; RANG, 2007).

Como neurotransmissor, sua ação após ser liberado na fenda sináptica, acontece sobre os receptores acoplados a proteína G, nomeados de receptores metabotrópicos, abrindo canais iônicos por meio de segundos mensageiros, tanto em neurônios pré-sinápticos quanto em pós-sinápticos. Após sua ação nos receptores, as moléculas restantes sofrem reações catabólicas provenientes do grupo de enzimas MAO (monoamina oxidase) as quais convertem a dopamina em dihidroxifenilacético (DOPAC) (DALE; RANG, 2007).

Atualmente, o sistema dopaminérgico possui cinco tipos de receptores, subdivididos em duas grandes famílias. A D1 composta pelos receptores D1 e D5, e a família D2 que inclui os receptores D2, D3 e D4. Dessa forma, na primeira família, os seus receptores ativam a adenilatociclase enquanto que os receptores da segunda família se comportam como inibidores dessa enzima. Em geral, a expressão desses receptores acontece ao longo de todas as vias do sistema dopaminérgico com distribuições diferentes cuja presença, geralmente, apresenta função e efeitos contrários (DALE; RANG, 2007).

2.6 DOPAMINA E SUA REGULAÇÃO DO CICLO SONO-VIGÍLIA

Os neurônios dopaminérgicos mais envolvidos na regulação dos ciclos de sono-vigília estão localizados no mesencéfalo superior e recebem o nome de *long-length system* ou “sistema de longa duração” (MONTI; MONTI, 2007).

Um grupo de neurônios dopaminérgicos inicia-se da substância nigra projetando-se até o striatum dorsal, enquanto que um segundo grupo projeta-se da Área Tegmentar Ventral (do inglês, VTA) até: a) área septal; tubérculo olfatório; núcleo accumbens; complexo amígdaloide finalizando no córtex piriforme (projeção mesolímbica), e b) áreas do córtex pré-frontal medial; cíngulo e entorrinal (projeção mesocortical) (MONTI; MONTI, 2007). Nesse sentido, os núcleos mesencefálicos dopaminérgicos de maior importância, a substância nigra (SNc), área tegmentar ventral (VTA) e algumas estruturas correspondentes ao gânglio basal (striatum e globo pálido) recebem inervações de neurônios do tronco cerebral, hipotálamo e prosencéfalo basal envolvidos diretamente na regulação homeostática do ciclo sono-vigília (MONTI; MONTI, 2007)

Dentro dessa cenário, uma interação recíproca entre neurônios dopaminérgicos da SNc/VTA e núcleo da rafe dorsal (neurônios serotoninérgicos); *Locus coeruleus* (neurônios noradrenérgicos); núcleos tegmentares laterodorsais e pedunculopontinos (contendo acetilcolina), núcleos tuberomamílares (contendo neurônios histaminérgicos), hipotálamo lateral (orexina), área preoptica e prosencéfalo basal (contendo acetil colina e neurônios GABA) (MONTI; MONTI, 2007)

O que se sabe atualmente sobre a atuação da dopamina na regulação da vigília e do sono é em função de dados obtidos a partir de 1) camundongos knockout para receptores dopaminérgicos; 2) animais com perda celular induzida na SNc e VTA por neurotoxinas; 3) estudos farmacológicos que analisam os efeitos da interação entre agonistas e antagonistas seletivos de dopamina em animais de laboratório (MONTI; MONTI, 2007).

Wisor et al (WISOR et al., 2001) quantificou o ciclo sono-vigília em camundongos knockout homozigotos e heterozigotos e comparou com o ciclo sono-vigília de camundongos-irmãos selvagens. Em condições estáveis, camundongos

homozigotos apresentaram aumento significativo de vigília e diminuição no sono NREM durante fase clara em comparação com o grupo heterozigotos e selvagem.

Não obstante, administrações sistêmicas ou intercerebrais de MPTP (neurotoxina quimicamente similar à heroína) ocasiona perdas de células em núcleos monoaminérgicos do tronco cerebral levando a uma síndrome semelhante à doença de Parkinson (WILLIAM LANGSTON et al., 1984). Injeções sistêmicas de dose única (2 mg/kg) de MPTP suprimem de modo seletivo o sono REM por um período de 2-3 horas em gatos. Todavia, injeções intercaladas de MPTP em doses de 5mg/kg durante 5 dias consecutivos reduzem o sono REM de tal modo que esse desequilíbrio assim permanece por um período de até 10 dias após a administração da última dose (TAKADA; LI; HATTORI, 1987).

Por último, cada vez mais estudos levam em consideração a modulação farmacológica da dopamina por meio da aplicação de agonistas e antagonistas seletivos. A administração intravenosa ou intraperitoneal do agonista seletivo para receptores D1 dopaminérgicos, SKF 38393, foi capaz de induzir dessincronização no eletroencefalograma durante comportamento de excitação em coelhos e ratos (PUNGOR et al., 1993). Entretanto, o antagonista D1, S C H 23390, produziu um estado de sedação em macacos e coelhos durante o experimento (BO et al., 1987). Portanto, os estudos aqui mencionados têm tentando demonstrar que a sinalização modulada pela dopamina exerce uma função importante na regulação e manutenção homeostática do ciclo de sono-vigília.

2.7 HALOPERIDOL

O haloperidol é um fármaco pertencente à primeira geração de antipsicóticos, nomeados como típicos. Atualmente, aqueles mais recentes também considerados atípicos, como a clozapina e risperidona, diferenciam-se do anterior por uma menor tendência em ocasionar efeitos motores adversos. Embora a atuação do haloperidol ocorra em uma variedade de receptores (adrenérgicos alfa, histaminérgicos H1, colinérgicos muscarínicos e serotoninérgicos T-HT2), grande parte devido à sua estrutura similar às butirofenonas, sua principal ação antipsicótica acontece pela ligação de força antagônica aos receptores dopaminérgicos, especialmente D2, localizados na via mesolímbica e cortical. Por essa razão, sua prescrição é utilizada

no tratamento de casos esquizofrênicos, psicose induzida por drogas como LSD, psilocibina, anfetamina, ketamina, fenciclidina, comportamento hiperativo e agressivo e Doença de Huntington (RANG & DALE, 2011).

Não obstante, a evolução do tratamento pode vir acompanhada de efeitos colaterais. Sonolência, morosidade e velocidade de resposta diminuída aos estímulos externos são relatadas, todavia, os usuários podem facilmente despertar, realizar suas atividades cotidianas mantendo funções cognitivas intactas. Com o passar dos dias, os sintomas de alucinação, delírios, ideias incoerentes e desorganizadas apresentam melhoras significativas (RANG & DALE 2011).

Nesse sentido, os efeitos adversos recorrentes ao uso desse fármaco são oriundos do seu antagonismo aos receptores acima mencionados. Sedação, hipotensão ortostática, letargia, boca seca, tremores, aumento de peso corporal, inibição de peristaltismo, indução da secreção de prolactina como consequente, de lactação; casos depressivos acompanhados de pensamentos suicidas diante de uso prolongado, assim como efeitos extrapiramidais: distonia aguda e discinesia tardia resultantes do bloqueio dos receptores dopaminérgicos D2 (MONTI; MONTI, 2007). Diante disso, as distonias agudas são caracterizadas pela presença de movimentos involuntários semelhantes aos observados na doença de Parkinson. Costumam acontecer logo nas primeiras semanas de tratamento e podem ser revertidos com a retirada da medicação. Entretanto, para os casos de discinesia tardia composta por movimentos involuntários da língua, face, tronco e membros, em torno de 20-40% dos pacientes desenvolvem após meses ou anos ao uso de antipsicóticos típicos tornando-se um quadro crônico e irreversível (PATRICK, 2002)

Em relação aos parâmetros farmacocinéticos do haloperidol, seu pico plasmático acontece em um período de 6-8 horas em dose oral, e 20 minutos após administração intramuscular. Sua biodisponibilidade oral é de 60-70% e o tempo de meia vida média é de 24h após administração oral e de 21h sob aplicação intramuscular. Seu metabolismo é processado pelo sistema enzimático da citocromo P450, mais especificamente pelo CYP3A4 ou CYP2D6, apresentando taxas médias de 92% de ligação à proteínas plasmáticas podendo ser excretado pelas fezes (60%) e urina (40%) (PATRICK, 2002).

2.8 HALOPERIDOL E EFEITOS SOBRE CICLO SONO-VIGÍLIA

Uma vez que a dopamina influencia na regulação do sono e no ritmo circadiano, seria de esperar que drogas antagonistas aos seus receptores influenciariam nessa dinâmica. Em geral, tanto os antipsicóticos típicos como atípicos tendem a promover o efeito de sono, entretanto, não há estudos substanciais definitivos acerca de como eles interferem na estrutura global do ciclo sono-vigília.

Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado através de medidas subjetivas e recursos polissonográficos que ambos os tipos de antipsicóticos aumentam o tempo total e a eficiência do sono, acompanhado de uma melhora nos aspectos clínicos. Contudo, existem efeitos adversos nas ações dos diferentes medicamentos, que alteram os parâmetros homeostáticos do ciclo, especialmente na percentagem do sono REM. Os distintos perfis farmacológicos observados atuam em múltiplos sistemas neurotransmissores além da dopamina, que incluem: serotonina, noradrenalina e histamina (Miyamoto et al., 2005).

Ademais, em um estudo onde a qualidade de sono em pacientes hospitalizados era medido de modo subjetivo, distúrbios de sono foram persistentes na maioria dos pacientes que faziam uso de antipsicóticos, demonstrando nesse contexto uma limitada eficiência farmacológica em promover uma melhoria na qualidade do sono (Waters et al., 2012).

O haloperidol e sua função como antagonista dos receptores D2 dopaminérgicos, tem sido usado em estudos que buscam compreender como bloquear esses receptores interferem na dinâmica vigília e sono. A aplicação de altas doses de haloperidol (0,02-1 mg/kg) tem demonstrado reduzir o tempo de vigília, aumentando os estágios de sono NREM e sua densidade de potência nas bandas de baixa frequência. (MONTI et al., 1988).

Além disso, algumas evidências sugerem que em camundongos saudáveis a aplicação de haloperidol altere a composição e a dinâmica do ciclo circadiano. A

administração aguda de haloperidol é capaz de induzir a expressão de Per1 no sistema nervoso central de ratos através de receptores NMDA e sinalização por CREB, prejudicando a ritmicidade de genes correlacionados à homeostase do ciclo circadiano (VIYUCH et al., 2005).

Não obstante, Anna Wirz-Justice et al observou durante 7 meses os efeitos adversos que antipsicóticos ocasionavam sobre o ciclo circadiano de pacientes esquizofrênicos ou doenças neurodegenerativas. A aquisição dos resultados mostrou que, após o início da administração de haloperidol em pacientes de estágios iniciais da doença de Alzheimer, os ciclos de repouso-atividade tornaram-se completamente arrítmicos por um período de 2 meses assim como, um declínio cognitivo importante foi observado no mesmo período (WIRZ-JUSTICE; HAUG; CAJOCHEN, 2001).

Todavia, a administração de haloperidol não só afeta o ciclo circadiano e funções motoras, mas também cognitivas. França et al, submeteu camundongos injetados com haloperidol à tarefas de reconhecimento de objetos gravando posteriormente, o ciclo de sono-vigília. Como resultado, observou um decréscimo na duração de sono REM entre o grupo haloperidol e o grupo veículo (controle) onde a diminuição de sono REM no grupo haloperidol foi correlacionada com uma menor taxa de preferência desses animais ao reconhecimento de novos objetos (FRANÇA et al., 2015).

Diante disso, para formação de memórias hipocampais de longo prazo se faz necessária a síntese de novas proteínas requeridas ao remodelamento do citoesqueleto de novas ou antigas espinhas dendríticas (HALL; THOMAS; EVERITT, 2000). Nesse sentido, a expressão de vários genes é induzida durante a potenciação de longo prazo (do inglês, LTP), para a consolidação das memórias. Esses genes incluem os iniciais imediatos (*IEGs*), *BDNF* (fator neutrófico derivado do cérebro), *Zif268* e *C/EBP β* . No entanto, as cascatas bioquímicas que levam à formação dessas proteínas não acontecem de forma rápida, começando 2 horas após o início do estímulo de potenciação. Logo, a estabilidade de uma LTP seja para remodelação, aumento da densidade pós-sináptica, alongamento de espinhas dendríticas ou formação de sinapses *de novo* requer muitas horas e até dias (GRØNLI; SOULÉ; BRAMHAM, 2014).

Logo, o impacto da privação de sono na plasticidade sináptica de longo-prazo tem sido alvo de estudos na última década. Estudos em roedores mostram não só que a memória depende do sono, mas que o sono deve ocorrer dentro de uma janela específica pós-aprendizado (GRØNLI; SOULÉ; BRAMHAM, 2014). Mais especificamente, o sono REM apresenta papel importante na consolidação da memória. Foi demonstrado que a privação seletiva de sono REM imediatamente ou após 12 h da tarefa de aprendizado prejudicou a consolidação de memórias em ratos (WALSH; BOOTH; POE, 2011).

Voltando à questão do haloperidol, será que esse fármaco, interferindo na arquitetura de sono, levaria a um déficit cognitivo de seus pacientes? Uma pergunta ainda sem respostas concretas. Contudo, alguns estudos como o de França et al, mostram que a administração do fármaco foi capaz de diminuir, imediatamente pós-treino cognitivo até horas após o tratamento, os níveis plasmáticos hipocâmpais de fatores como *pCaMKII*, *Zif268* e *BDNF*, associados à consolidação de memórias (FRANÇA et al., 2015).

Por fim, nossa pergunta visa entender como esse fármaco, o haloperidol, atua na arquitetura do sono, possivelmente alterando a distribuição de sono REM, analisando a presença de efeitos tardios dessa droga na constituição do ciclo sono-vigília de camundongos.

3.0 OBJETIVOS

O presente trabalho objetiva investigar a ação tardia ou de rebote de um modulador dopaminérgico de ação antagonista não específica sobre receptores D2, o haloperidol, na arquitetura do Sono de ondas lentas (sono profundo), vigília e REM através da análise de mapas de estado e da mensuração da quantidade e duração temporal dos episódios de todas as fases, ao longo de 4 horas de registros eletroencefalográficos, mais especificamente, da hora 5 a hora 9 pós injeção de fármaco .

4.0 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS.

Para realização desse estudo, o registro eletrofisiológico de nove animais foram escolhidos. Estes, pertenciam a um pool de 116 animais oriundos de pesquisas anteriores (FRANÇA et al., 2015), mas cujo critério de seleção tomou como base a qualidade do registro a ser analisado. Nesse sentido, 9 machos adultos (2-5 meses) passaram por cirurgias para implante de eletrodos e foram abrigados em gaiolas durante 12h claro/12h escuro. O ciclo diário iniciava-se às 07:00, com comida e água *ad libitum*. Para adaptação bem como diminuição do nível de stress dos animais, eles eram manipulados diariamente 10 vezes durante 5 minutos antes dos experimentos. Todos os procedimentos realizados, do acondicionamento, cirurgias e testes comportamentais foram realizados seguindo todos os protocolos do *National Institutes of Health*, devidamente aprovado pelo comitê de ética ELS-IINN (protocolo 08/2010).

4.2 TESTE PARA PREFERÊNCIA DE NOVOS OBJETOS.

O princípio base do teste consistiu na observação da tendência natural que os roedores demonstraram em explorar o novo ambiente. A tarefa empregou 6 diferentes objetos apresentados duas vezes em dias seguidos. Quatro desses objetos, foram apresentados durante a primeira sessão exploratória (duração de 10 minutos) sendo 2 deles posteriormente substituídos por objetos não-familiares na segunda sessão, 24h depois. Não obstante, todos os experimentos comportamentais analisados tiveram início e término das 10:00h às 22:00h, respectivamente, cuja atividade deu-se em aparatos de campo aberto nas dimensões (50cm de diâmetro x 30cm de altura).

Seguido a exploração de novos objetos, os animais foram injetados com solução salina ou haloperidol sendo permitido o livre comportamento desses animais durante a primeira sessão. Para àqueles submetidos à eletrofisiologia, duas sessões pares de treinamento-teste foram realizadas com 7 dias de intervalo. A primeira com injeção de solução salina e a segunda com haloperidol. A locomoção foi mensurada como a distância total percorrida pelo camundongo por sessão.

4.3 TESTE DE EXPOSIÇÃO ÚNICO.

Para as análises imuno-histoquímicas, foram utilizados camundongos previamente expostos a 10 sessões de ambientação (*handling*), e 10 minutos de uma sessão com 4 novos objetos, como descrito anteriormente. Todos os experimentos foram conduzidos das 08:00 até as 10:00. Os animais receberam uma injeção na concentração de 0.1mg/10g de haloperidol (0.3mg/kg) ou salina (0,9%) imediatamente pós-exploração. Após o experimento, os animais foram devolvidos às suas gaiolas monitorando seu comportamento de vigília (wake), sono de ondas lentas (sws) e rem.

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA.

Os animais foram anestesiados com isoflurano e perfusionados com solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato. Os cérebros foram removidos e colocados em solução 30% sacarose sob temperatura 4° por 24h. Posteriormente, os cérebros foram congelados, frontalmente seccionados em 30 picnômetros no criostato (Zeiss), descongelando-se em lâminas de vidro.

4.5 INJEÇÕES DO GRUPO VEÍCULO E HALOPERIDOL.

Os animais analisados foram submetidos à injeções de solução salina (0,9 mg/kg) por via intraperitoneal anteriormente ao teste de reconhecimento de objetos. Posteriormente, o mesmo grupo foi submetido à injeção de haloperidol na concentração de 0,3mg/kg por via intraperitoneal, e seus registros encefalográfico gravados por 12 horas.

4.6 REGISTROS DO CICLO SONO-VIGÍLIA

LFP e gravações de vídeo foram utilizadas em combinação para identificar os diferentes períodos. A análise espectral de LFP foi utilizada para identificar e quantificar a ocorrência de WK (vigília), sono de ondas lentas e REM. O comportamento bem como os registros eletroencefalográficos foram continuamente observados e gravados em tempo real durante 12h. Entretanto, apenas o intervalo de 5-8 horas foi utilizado para comparações entre os tratamentos observados.

Por fim, toda metodologia retratada até aqui foi realizada durante os experimentos de França et al (FRANÇA et al., 2015) . O nosso trabalho debruçou-se sobre a análise dos mapas de estados e hipnogramas a serem discutidos nos próximos tópicos.

4.7 ANÁLISE DOS MAPAS DE ESTADO.

Para análise dos mapas de estado (state maps) foram utilizados os registros eletrofisiológicos de 12 animais, sendo 6 do grupo salina (controle) e 6 do grupo haloperidol. Cada um dos animais obteve 12 horas de registros e para cada hora foi analisado um mapa de estado.

Os mapas de estado ou *state maps* consistem em uma técnica gráfica multidimensional que utiliza duas faixas espectrais e medidas de coerência permitindo a visualização da dinâmica de despolarização em larga escala de grupamentos neurais no ciclo sono-vigília, com foco nas transições espontâneas entre esses estados (GERVASONI et al., 2004)

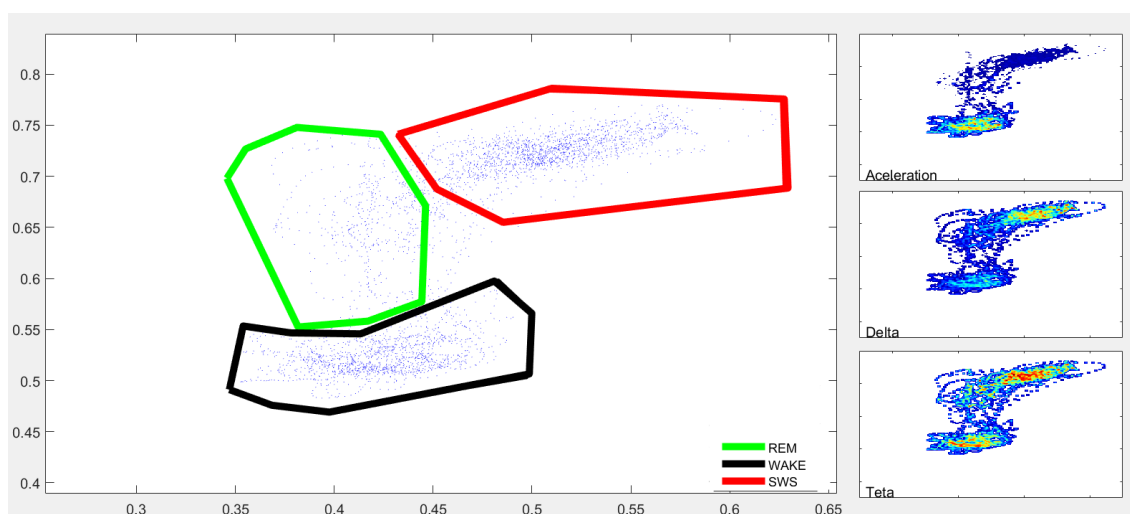


Figura 1. Representação bidimensional de estados cerebrais do ciclo sono-vigília. O state map (mapa de estado) representado na figura, mostra no quadrante superior direito a região de atividade neural no sono de ondas lentas (SWS), enquanto que a vigília está representada no quadrante inferior (WAKE) e no quadrante superior esquerdo encontra-se a região de sono REM.

A seleção das regiões de interesse é feita manualmente, levando em consideração os gráficos auxiliares (à direita). Para seleção da vigília, considera-se a região mais ativa do gráfico de aceleração – uma vez que se subentende que nesse

período o camundongo está mais ativo fisicamente. Para a seleção do quadrante de sono profundo (SWS) foi utilizado como referência o gráfico de ondas delta (cuja frequência varia de 1.0-4,5Hz) uma vez que segundo a literatura vigente, esse tipo de oscilação junto com oscilações mais lentas de frequência inferior a 1Hz, classificariam melhor a entrada de sono NREM (ADAMANTIDIS; GUTIERREZ HERRERA; GENT, 2019) Não obstante, para o sono REM, a seleção foi feita com base na região de maior intensidade de ondas Teta (baixa amplitude e elevada frequência, que em roedores aparece na faixa de 6-9Hz) as quais caracterizam o sono REM principalmente quando associados à ausência de tônus muscular (ADAMANTIDIS; GUTIERREZ HERRERA; GENT, 2019)

Por fim, as regiões correspondentes ao SWS ou sono NREM estão localizadas no quadrante direito superior, enquanto que o sono REM localiza-se na região superior esquerda e a vigília na inferior esquerda. Os pontos que não se determinam nos grupamentos principais, formam parte das zonas de transições que foram assim determinadas pela mudança espectral mais rápida entre um cluster (grupo) e outro.

4.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS EPISÓDIOS.

Para cada mapa de estado, um hipnograma, que constitui um gráfico representativo da macroestrutura do estadiamento do sono, foi gerado. A partir disso, foram contados os números de episódios de cada estágio ao longo de uma hora e computado em uma tabela.

Nesse sentido, para cada animal dos grupos (salina x haloperidol) foram construídos 4 hipnogramas e computados os números de episódios respectivos de sono REM, SWS e vigília. Desses valores, foram feitas comparações estatísticas a fim de saber se havia diferença na distribuição de frequência desses estados para a 5^o, 6^o, 7^o e 8^o hora analisadas entre os grupos controle (salina) e haloperidol.

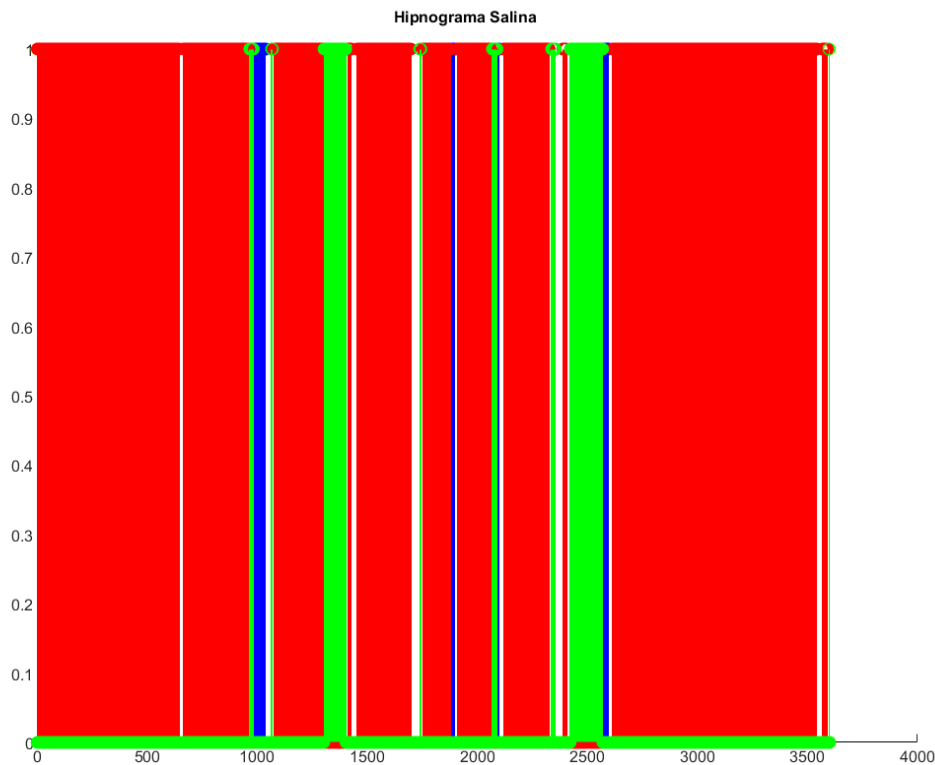


Figura 2. Hipnograma da quarta hora do grupo controle. Nesse gráfico observam-se a macroestrutura de um ciclo de uma hora de registro em camundongos. Em vermelho, observa-se as regiões de sono NREM (sws); em azul as regiões que representam a vigília e em verde as regiões de sono REM.

4.9 ANÁLISE QUALITATIVA DA DURAÇÃO DE CADA ESTÁGIO DO CICLO SONO-VIGÍLIA.

Foram contabilizados a duração (segundos) de cada episódio de sono NREM, REM e vigília para cada uma das 4 horas de registro, em ambas as aplicações de salina e haloperidol. Essa contagem foi feita a partir de informações passadas pelo hipnograma projetado a partir dos mapas de estado.

Os resultados obtidos foram computados em uma planilha *Excel*, cujo somatório final dos segundos em cada estágio (REM, NREM e Vigília) foram usados a fim de comparação entre as horas elegidas (5^o, 6^o, 7^o e 8^o) para as aplicações de salina e haloperidol.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os dados obtidos da análise dos episódios foram computados em tabelas, divididas em número de episódios contados em REM, NREM e vigília, para ambos os grupos (salina e haloperidol) para cada hora analisada (5^o, 6^o, 7^o, 8^o hora de registro). Além da quantidade de episódios/hora foram também computados a quantidade de segundos contados em cada um desses episódios considerados. Posteriormente, na plataforma estatística *GraphPad Prism 5*, foram realizadas comparações estatísticas não-paramétricas pareadas (Wilcoxon signed rank test) e teste t pareado de Student, conforme sugerido pelo teste de normalidade de Shapiro- Wilk.

5.0 RESULTADOS.

Das 12 horas de registros, foram selecionadas para análise apenas o intervalo de 5-8 horas. Durante esse período, não foram observadas diferenças significantes entre o grupo controle (salina) e o grupo haloperidol, com exceção no percentual de tempo despendido em sono REM.

5.1 RESULTADOS DOS EPISÓDIOS NOS INTERVALOS DE VIGÍLIA;

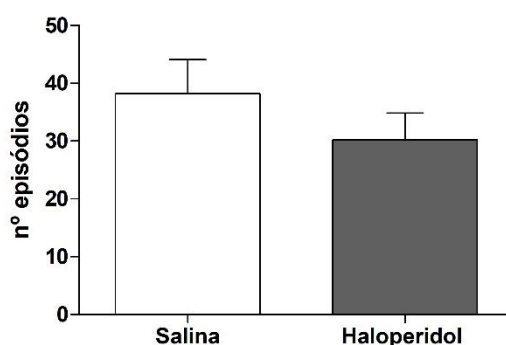


Figura 3 Efeito do haloperidol no número de episódios durante a vigília. Camundongos com eletrodos implantados foram injetados com solução salina (0,9%) ou haloperidol (0.3mg/kg) e registrados no período de 5-8 horas após a injeção.

Realizamos o teste de Wilcoxon para comparação dos dois grupos. Em ambas as análises, não houve diferença significativa com relação ao número de episódios.

5.2 RESULTADOS DOS EPISÓDIOS NOS INTERVALOS DE SONO DE ONDAS LENTAS (SWS);

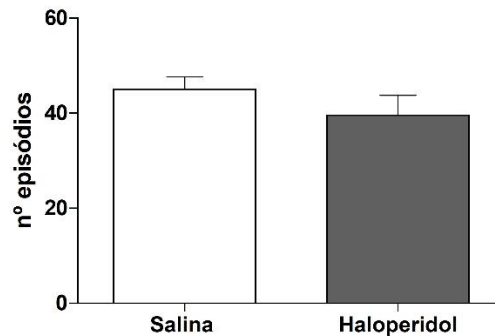


Figura 4. Efeito do haloperidol no número de episódios tardios de sono de ondas lentas. Camundongos com eletrodos implantados foram injetados com solução salina (0,9%) ou haloperidol (0.3mg/kg) e registrados de 5-8 horas após a injeção. Realizamos o teste de Wilcoxon para comparação dos dois grupos. Em ambas as análises, não houve diferença significativa com relação ao número de episódios.

5.3 RESULTADOS DOS EPISÓDIOS NOS INTERVALOS DE SONO REM;

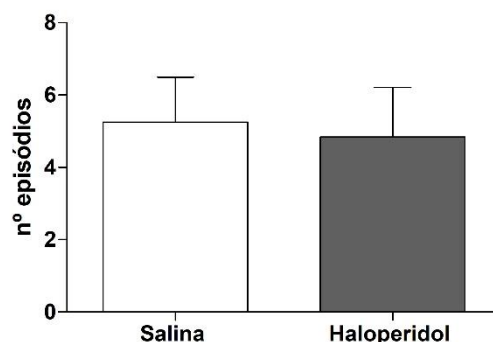


Figura 5. Efeito do haloperidol no número de episódios tardios de sono REM. Camundongos com eletrodos implantados foram injetados com solução salina (0,9%) ou haloperidol (0.3mg/kg) e registrados de 5-8 horas após a injeção. Realizamos o

teste de Wilcoxon para comparação dos dois grupos. Em ambas as análises, não houve diferença significativa com relação ao número de episódios.

5.4 RESULTADO DO TEMPO DESPENDIDO (DURAÇÃO) EM VIGÍLIA;

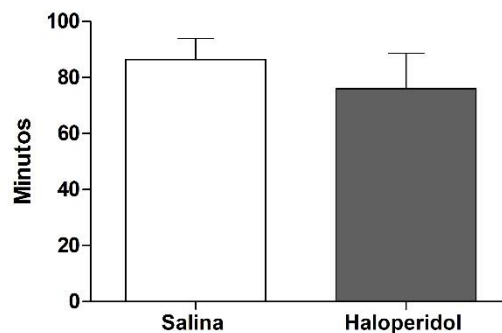


Figura 6 Efeito do haloperidol na duração de tempo despendido em vigília. Camundongos com eletrodos implantados foram injetados com solução salina (0,9%) ou haloperidol (0.3mg/kg) e registrados de 5-8 horas após a injeção. Realizamos o teste de Wilcoxon para comparação dos dois grupos. Em ambas as análises, não houve diferença significativa com relação ao número de episódios.

5.5 RESULTADO DO TEMPO DESPENDIDO (DURAÇÃO) EM SONO DE ONDAS LENTAS (SWS);

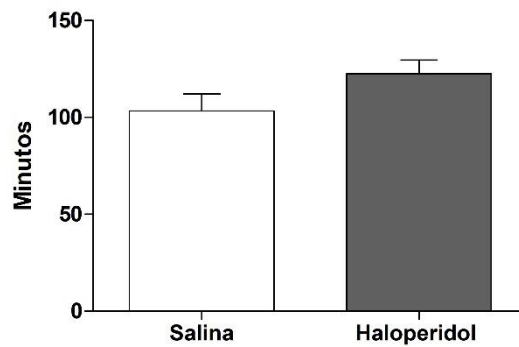


Figura 7. Efeito do haloperidol na duração de tempo despendido em sono de ondas lentas. Camundongos com eletrodos implantados foram injetados com solução salina (0,9%) ou haloperidol (0.3mg/kg) e registrados de 5-8 horas após a injeção. Realizamos o teste de Wilcoxon para comparação dos dois grupos. Em ambas as análises, não houve diferença significativo com relação ao número de episódios.

5.6 RESULTADO DO TEMPO DESPENDIDO (DURAÇÃO) EM SONO REM;

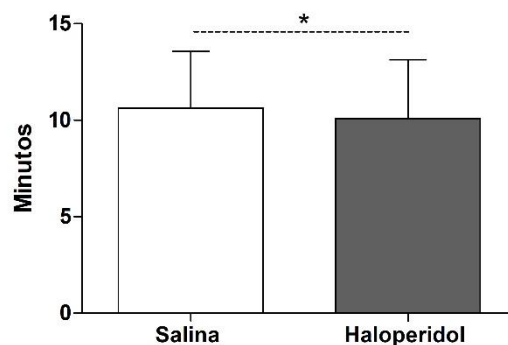


Figura 8 Efeito do haloperidol na duração de tempo despendido em sono REM. Camundongos com eletrodos implantados foram injetados com solução salina (0,9%)

ou haloperidol (0.3mg/kg) e registrados de 5-8 horas após a injeção. Realizamos o teste de Wilcoxon cujo valor de p para o haloperidol foi significativo (*p=0,02).

6.0 DISCUSSÃO

A regulação do ciclo sono vigília requer uma orquestra de ativação e supressão de diferentes grupos neuronais, bem como de diferentes neurotransmissores visando uma regulação fina desse processo. Não obstante, a dopamina é um dos neurotransmissores que atua nessa dinâmica e, embora seja mais reconhecida pela sua atuação na memória e na motivação, recentemente estudos tem acreditado papel importante na manutenção do sono.

Nossos resultados mostram que a princípio, não há diferença significativa entre o percentual de episódios de sono NREM, REM e vigília (Figura 3; 4; 5) entre os grupos analisados e que a duração (quantidade de segundos contados em cada episódio) também não difere significativamente (Figura 6; 7) com exceção do sono REM (Figura 8) que apresentou menor tempo de REM no sono tardio (da 5^o até 8^o pós injeção).

Diante disso, os resultados encontrados refletem o que a literatura já tem comentado acerca de como a privação de sono, especialmente o REM, afeta as funções cognitivas do cérebro. Isso acontece porque após a aquisição de um novo aprendizado, a expressão de genes relacionados à plasticidade como *Zif68*, *BDNF* e *pCaMKII* aumenta. Entretanto, a presença do haloperidol, tende a diminuir a expressão desses genes nos neurônios hipocampais (FRANÇA et al., 2015)

Além disso, em seres humanos, a consolidação de memórias de alta complexidade que integram memórias de procedimento à componentes emocionais são mais vulneráveis à privação de sono REM (GRØNLI; SOULÉ; BRAMHAM, 2014). Ademais, durante o sono a maioria dos genes que são expressos estão relacionados à regulação da homeostase circadiana e de seus ritmos, estresse oxidativo e metabolismo. Em camundongos, mudanças específicas que ocorrem a nível de córtex cerebral durante o sono envolvem a expressão de 2090 RNAs mensageiros (GRØNLI; SOULÉ; BRAMHAM, 2014). Em seres humanos saudáveis, uma semana de privação de sono (apenas 6 horas por dia) foi capaz de afetar a expressão de 711 RNA's

mensageiros em células sanguíneas quando comparados a indivíduos não privados de sono (GRØNLI; SOULÉ; BRAMHAM, 2014). Além disso, a insuficiência de sono tem sido associada à baixa performance cognitiva durante testes de atenção (GRØNLI; SOULÉ; BRAMHAM, 2014). Todos esses estudos suportam a ideia de que cascatas bioquímicas celulares são “recarregadas” durante o sono em busca de otimizar suas funções na vigília.

Não obstante é importante salientar que a atuação do haloperidol não se dá somente em receptores D2 dopaminérgicos, mas atuam fracamente nos receptores D1 assim como outros sistemas neurotransmissores, como o sistema serotoninérgico e gabaérgico. Portanto, como a sua ação sobre esses diferentes receptores leva à condição de bloqueio de sono REM tardio? Em especial os dopaminérgicos? Estudos mostram que uma dose alta de haloperidol em receptores D2 tem efeito na redução da vigília e aumento de sono NREM, assim como um efeito na densidade de ondas de baixa frequência (MONTI et al., 1988). Entretanto, seus efeitos em receptores D1 levam ao aumento do primeiro estágio de sono NREM, aumento da frequência de ondas Delta observadas ao EEG e aumento da duração dos fusos do sono sem alteração do sono REM (MONTI; MONTI, 2007).

Logo, nosso trabalho apresenta algumas limitações. A primeira delas corresponde à menor precisão do *state map*, uma vez que a seleção dos clusters de sono REM, NREM e vigília é manual. Em paralelo, há uma alteração do padrão de sono-vigília apresentado ao *state map* sob efeito do haloperidol, o que torna difícil definir com exatidão a circunferência das regiões. Outros pontos limitantes foram o fato de as seleções não terem sido cegas e a base do trabalho foi feita com dados de outra pesquisa prévia, sendo assim, não tivemos como idealizar o experimento para a coleta de sono tardio em todos os animais originais, lidando ao final, com um número limitado de animais para análise.

Por fim, embora nossa hipótese sobre um aumento evidente de sono profundo e diminuição de estados de alerta tenha sido refutada pelos resultados, é importante salientar que há poucos estudos que levam em conta a função do sistema dopaminérgico na homeostasia do ciclo circadiano bem como na arquitetura do sono. É pertinente que se discuta sobre isso, especialmente quando levamos em conta o sono REM e a suas funções de consolidação de memórias, formação de novas

sinapses durante processos de aprendizagem, bem como desenvolvimento do sistema nervoso central em crianças e jovens.

7.0 CONCLUSÃO

Dormir compõe uma parte importante da rotina da maioria dos animais. Um sono de qualidade é tão essencial quanto ingestão de água e nutrientes. Sem um mecanismo adequado de sono, o cérebro não é capaz de manter um padrão adequado de aprendizado, formação de novas memórias, sustentação de mecanismo de alerta e concentração.

Diferentes mecanismos compõe os complexos estados de consciência durante o ciclo de vigília e sono, entretanto, ao objeto desse estudo, a dopamina, tem sido cada vez mais agregado um papel importante na manutenção dessa dinâmica. De modo que, a consequência de interferentes na homeostasia desse neurotransmissor, que pode acontecer em situações de uso farmacológico de antipsicóticos ou neurolépticos, como haloperidol, por pessoas portadoras de esquizofrenia, síndrome de Tourette, hiperatividade em crianças ou outros distúrbios comportamentais de agitação, mania, insônia e psicose, pode levar a alterações na arquitetura do sono e, a longo prazo interferir na saúde cognitiva desses pacientes.

Nesse sentido, este trabalho se propôs a entender em parte como a inibição das vias ligadas ao receptor D2 são capazes de interferir na arquitetura do sono. Logo, o que se pode concluir dos nossos resultados é que na presença de uma substância antagonista ao receptor D2 da dopamina, especificamente o haloperidol, não há diferença quantitativa entre sono NREM, vigília e REM, com exceção de uma diminuição no percentual de tempo de sono REM (nas três horas analisadas). Portanto, se faz necessário um estudo mais aprofundado do tema, que amplie temporalmente essa análise a fim de que se possa comprovar ou não, a real interferência desse fármaco no ciclo sono-vigília.

Por fim, ainda que não esteja bem estabelecido, o uso do haloperidol como modulador do sistema dopaminérgico, tem potencial para interferir na regulação dos mecanismos de sono-vigília, uma vez que a neurociência tem considerado cada vez

mais, o papel da dopamina como agente importante na ativação e regulação de populações neurais associadas à vigília e sono REM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ADAMANTIDIS, A. R.; GUTIERREZ HERRERA, C.; GENT, T. C. **Oscillating circuitries in the sleeping brain** *Nature Reviews Neuroscience*, p.4-8, 2019.

BO, P. et al. Selectivity and interaction of D-1 and D-2 antagonists. Neurophysiological and behavioural study. **Pharmacological Research Communications**, p. 10-12, 1987.

COLEBROOKE, R. E. et al. Age-related decline in striatal dopamine content and motor performance occurs in the absence of nigral cell loss in a genetic mouse model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, p.12, 2006.

DALE, M. M.; RANG, H. P. **Rang & Dale's pharmacology. 6th ed(Edinburgh): Churchill Livingstone**, p. 204-215, 2007.

FRANÇA, A. S. C. et al. D2 dopamine receptor regulation of learning, sleep and plasticity. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 4, p. 493–504, 2015.

GERVASONI, D. et al. Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions. **Journal of Neuroscience**, p.15-19, 2004.

MONTI, J. M. et al. Biphasic effects of dopamine D-2 receptor agonists on sleep and wakefulness in the rat. **Psychopharmacology**, p.124-127, 1988.

NUNN, C. L.; SAMSON, D. R.; KRYSTAL, A. D. **Shining evolutionary light on human sleep and sleep disorders** *Evolution, Medicine and Public Health*, p. 4, 2016.

PATRICK, K. S. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th Edition Edited by J. G. Hardman, L. E. Limbird, and A. G. Gilman. McGraw Hill, New York. 2001. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2002.

PUNGOR, K. et al. Paradoxical sleep deprivatory effect of a single low dose of MPTP which did not produce dopaminergic cell loss. **Experimental Brain Research**, p.7-9, 1993.

PURVES, D. et al. **Purves Neuroscience, Artmed**, p. 707-731, 2008.

TAKADA, M.; LI, Z. K.; HATTORI, T. Intracerebral MPTP injections in the rat cause cell loss in the substantia nigra, ventral tegmental area and dorsal raphe. **Neuroscience Letters**, p 5-6, 1987.

VIYPOCH, J. et al. Effect of haloperidol on mPer1 gene expression in mouse suprachiasmatic nuclei. **Journal of Biological Chemistry**, p. 3, 2005.

WIRZ-JUSTICE, A.; HAUG, H. J.; CAJOCHEN, C. Disturbed circadian rest-activity cycles in schizophrenia patients: An effect of drugs? **Schizophrenia Bulletin**, p.1-2, 2001.

WISOR, J. P. et al. Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. **Journal of Neuroscience**, p. 3 - 8, 2001.

ALLAN HOBSON, J. Electrographic correlates of behavior in the frog with special reference to sleep. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, p. 5-6, 1967.

COLEBROOKE, R. E. et al. Age-related decline in striatal dopamine content and motor performance occurs in the absence of nigral cell loss in a genetic mouse model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, p.12, 2006.

DALE, M. M.; RANG, H. P. **Rang & Dale's pharmacology. 6th ed(Edinburgh): Churchill Livingstone**, p. 204-215, 2007.

EILAND, M. M.; LYAMIN, O. I.; SIEGEL, J. M. State-related discharge of neurons in the brainstem of freely moving box turtles, *Terrapene Carolina major*. **Archives Italiennes de Biologie**, p.4-7, 2001.

FERNANDES, R. M. F. O SONO NORMAL. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, p.3 - 10, 2006.

FLANIGAN, W. F. et al. Sleep and wakefulness in chelonian reptiles. I. The box turtle, *Terrapene carolina*. **Archives Italiennes de Biologie**, p.227-252, 1974.

FRANÇA, A. S. C. et al. D2 dopamine receptor regulation of learning, sleep and plasticity. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 4, p. 493–504, 2015.

GRØNLI, J.; SOULÉ, J.; BRAMHAM, C. R. **Sleep and protein synthesis-dependent**

synaptic plasticity: Impacts of sleep loss and stress*Frontiers in Behavioral Neuroscience*, p. 1-5, 2014.

HALL, J.; THOMAS, K. L.; EVERITT, B. J. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. **Nature Neuroscience**, p.12, 2000.

LAPIERRE, J. L. et al. Cortical acetylcholine release is lateralized during asymmetrical slow-wave sleep in northern fur seals. **Journal of Neuroscience**, p.130, 2007.

MONTI, J. M. et al. Biphasic effects of dopamine D-2 receptor agonists on sleep and wakefulness in the rat. **Psychopharmacology**, p.54, 1988.

MONTI, J. M.; MONTI, D. **The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking***Sleep Medicine Reviews*, p.124-127, 2007.

SIEGEL, J. M. Mechanisms of sleep control. **Journal of Clinical Neurophysiology**, p. 110-123, 1990.

SIEGEL, J. M. **Do all animals sleep?***Trends in Neurosciences*, p.117-125, 2008.

STAFNE, G. M.; MANGER, P. R. Predominance of clockwise swimming during rest in Southern Hemisphere dolphins. **Physiology and Behavior**, p.919-926, 2004.

WALSH, C. M.; BOOTH, V.; POE, G. R. Spatial and reversal learning in the Morris water maze are largely resistant to six hours of REM sleep deprivation following training. **Learning and Memory**, p. 91-95, 2011.

WILLIAM LANGSTON, J. et al. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. **Brain Research**, p. 9-12, 1984.

YAMABE, M. et al. MC-SleepNet: Large-scale Sleep Stage Scoring in Mice by Deep Neural Networks. **Scientific Reports**, p.5-7, 2019.