JULIEN BRAGA CALAIS CORREIA PINTO

A expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica durante o sono REM após exposição a um ambiente enriquecido

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Neurociências e Comportamento
Orientador: Prof. Dr. Koichi Sameshima
Co-orientadora: Dr[a]. Elida Paula Benquique Ojopi

São Paulo
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Pinto, Julien Braga Calais Correia.
A expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica durante o sono REM após exposição a um ambiente enriquecido / Julien Braga Calais Correia Pinto; orientador Koichi Sameshima. -- São Paulo, 2009.
102 p.
Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Memória 2. Aprendizagem 3. Sono 4. Expressão gênica 5. Plasticidade neuronal I. Título.

BF371

FOLHA DE APROVAÇÃO

Julien Braga Calais Correia Pinto

A expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica durante o sono REM após exposição a um ambiente enriquecido

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Neurociências e Comportamento

Aprovada em:_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____Instituição _____

Julgamento _____Assinatura _____

Prof. Dr. _____Instituição _____

Julgamento _____Assinatura _____

Prof. Dr. _____Instituição _____

Julgamento _____Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À minha noiva **Elizabeth** com amor e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e ajuda indispensável durante a elaboração deste trabalho.

Ao meu pai **Luiz André** e à minha mãe **Nélia Cristina** pelo carinho e amor nutrido a mim, pelos ensinamentos e pelo incentivo emocional (e financeiro) que fizeram com que eu alcançasse os meus objetivos.

Aos meus avôs **Constantino** (***in memoriam***) e **Francisco (*in memoriam*)** e às minhas avós **Nadir** e **Maria (Minininha)** por sempre terem me incentivado e pela sabedoria e alegria que me passaram ao longo de todos esses anos.

Aos meus irmãos **Lander**, **Wyller** e **André Luiz** pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos.

Aos meus tios e tias pelos conselhos e lições que ajudaram a moldar a minha personalidade.

Aos meus primos e primas pela amizade e companheirismo desde a infância que induziram algumas de minhas melhores memórias.

Ao meu sogro **Chen** e à minha sogra **Margarida** por terem me aceitado em sua família e pelo apoio durante a confecção desse trabalho.

Ao **Luiz Fernando** pela sua alegria e carinho.

Aos amigos do **CEB** e da **Bio 37** pela companhia agradabilíssima.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao **prof. Dr. Koichi Sameshima** pelo incentivo, apoio, confiança e ensinamentos que foram fundamentais para o desenvolvimento do meu raciocínio científico e construção de habilidades profissionais essenciais para o meu crescimento acadêmico.

À **Drª. Elida Paula Benquique Ojopi** pelo apoio, atenção, estímulo e orientação valorosos que certamente foram cruciais para que eu ganhasse maturidade pessoal e profissional e tornaram os momentos dedicados a esse trabalho muito mais agradáveis.

Ao **prof. Dr. Sidarta Ribeiro** pelo ensino, supervisão e, principalmente, incentivo em momentos decisivos para o sucesso dessa empreitada.

Ao **Sérgio Arthuro Rolim** pela ajuda nos experimentos durante e após o horário comercial.

Ao grupo de eletrofisiologia do Laboratório "Cesar Timo-Iaria" **Dr. Edgard Morya**, **Eduardo Schenberg**, **Luiz Lana**, **Dr. Daniel Takahashi**, **Ana Carolina Bione Kunicki**, **Rafael Proença**, **Carlos Stein**, **Taísa Miranda**, **Marina Faveri** e **Birajara Machado** pelas discussões instigantes, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho (e no preenchimento dos milhares de formulários da FINEP) e por terem tornado o tempo que passei no laboratório muito mais agradável.

Ao grupo de genética do Laboratório de Neurociências (LIM 27) **Maria Carolina Athié**, **Giselle Izzo**, **Carolina do Prado**, **Dr. Fabio Mury**, **Bárbara Nogueira**, **Dra. Camila Teixeira**, **Heloisa Müller** e **Carolina Almeida** pela excelente convivência, companheirismo e pelo auxílio (e ensino) das técnicas empregadas nesse projeto.

À **profª. Drª. Sara Joyce Shammah Lagnado** e à **Carolina Jaqueta** pela ajuda na definição das regiões a serem analisadas e pelo ensino das técnicas de dissecação.

À **Drª. Ângela Cristina do Valle** e sua aluna **Gabriela Matos** pela ajuda no aperfeiçoamento dos eletrodos e da cirurgia de implante.

Ao **Bruno Brito** e à **Gabriela Fujisaka** pela ajuda no processamento dos encéfalos para histologia.

Ao **Hindiael Belchior** e ao **Hao Zhang** pela ajuda no estagiamento do sono.

Ao **prof. Dr. Luiz Roberto Britto** e à **prof^{a}. Dr^{a}. Débora Hipólide** pelas valorosas discussões que melhoram o trabalho.

A todos os membros das bancas de qualificação e defesa.

A todos os membros da AASDAP e do laboratório "Cesar Timo-Iaria".

A todos os membros do Laboratório de Neurociências (Lim-27).

Ao **Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo** pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao **Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** ao pela disponibilização da infra-estrutura necessária ao desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio Libanês** pela disponibilização da infra-estrutura necessária ao desenvolvimento desse projeto.

À **Associação Alberto Santos Dummont para Apoio à Pesquisa (AASDAP)** pela disponibilização da infra-estrutura necessária ao desenvolvimento desse projeto.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de estudos (processo 2006/05436-8) e auxílio financeiro (processo 2007/07366-0) para o desenvolvimento desse projeto

À **Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)**, pela concessão de auxílio financeiro (convênio referência FINEP n°. 2629/06, contrato n°. 01.06.1092.00) que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho.

To doubt everything or to believe everything are two equally convenient truths; both dispense with the necessity of reflection.

Henri Poincaré

RESUMO

Pinto, J.B.C.C. **A expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica durante o sono REM após exposição a um ambiente enriquecido.** 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Psicologia – Neurociências e Comportamento, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Diversas evidências demonstram que as diferentes fases do sono agem de maneira complementar e diferencial na consolidação de memórias. No entanto os mecanismos celulares e moleculares dessa relação não estão estabelecidos. Foi postulado que a melhor maneira para se entender como o sono facilita o aprendizado é contrastando evidências experimentais obtidas em presença ou ausência de informação adquirida recentemente; e que a plasticidade sináptica dependente de atividade é o melhor correlato celular para o aprendizado e memória. Portanto, analisamos a expressão dos genes relacionados à plasticidade sináptica *Arc, Bdnf, Camk4, Creb1, Egr1, Egr2, Fos, Nr4a1, Ppp2ca* e *Ppp2r2d* durante o sono de ratos adultos expostos ou não a um ambiente enriquecido. Nove dos 10 genes avaliados (*Arc, Bdnf, Creb1, Egr1, Egr2, Fos, Nr4a1, Ppp2ca* e *Ppp2r2d*) mostraram aumento da expressão após a exposição. A expressão de *Bdnf* no hipocampo estava aumentada durante os estágios marcados pela dessincronização da atividade elétrica do cérebro (vigília e sono REM) sugerindo que *Bdnf* poderia ser um marcador da homeostase do sono. Pela primeira vez demonstramos que exposição ao ambiente enriquecido promoveu aumento na expressão de genes (*Ppp2r2d, Ppp2r2ca*) que codificam para a proteína fosfatase 2A (PP2A). Dado o papel dessa proteína na plasticidade sináptica dependente de atividade sugerimos que esse evento seja importante para as modificações na morfologia e atividade neuronal observados após a exposição a um ambiente enriquecido. Por fim, o nosso trabalho mostra que ocorre a reindução de genes relacionados à potencialização sináptica durante SREM (*Egr1*, *Fos*). E, pela primeira vez, demonstrou-se que um gene que codifica para uma proteína relacionada à depressão da atividade sináptica também está reinduzido (*Ppp2r2d*) no hipocampo. Esses resultados reforçam a necessidade de uma reativação na atividade cerebral durante o sono e, pela primeira vez, mostram-se evidências experimentais que a potencialização e depressão da plasticidade sináptica ocorrem concomitantemente durante o sono.

Palavras-chave: MEMÓRIA; APRENDIZAGEM; SONO; EXPRESSÃO GÊNICA; PLASTICIDADE NEURONAL.

ABSTRACT

Pinto, J.B.C.C. **Expression of synaptic plasticity-related genes during REM sleep following novelty exposure.** 2009. 103 f. Dissertation (Master's degree) – Instituto de Psicologia – Neurociências e Comportamento, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Independent lines of evidence show differential and complementary roles of slow wave sleep and REM sleep in memory consolidation. However molecular and cellular mechanisms governing this relation are not known. It was suggested that comparison of experimental evidences obtained in presence or absence of recently acquired information is necessary to investigate sleep-dependent memory consolidation. It is well known that the activity-dependent synaptic plasticity is the best cellular and molecular correlate of learning and memory. Therefore we carried out experiments analyzing expression of synaptic plasticity-related genes (*Arc, Bdnf, Camk4, Creb1, Egr1, Egr2, Fos, Nr4a1, Ppp2ca* e *Ppp2r2d*) during sleep in adult rats exposed or not to a novel experience. Expression of nine out of 10 analyzed genes (*Arc, Bdnf, Creb1, Egr1, Egr2, Fos, Nr4a1, Ppp2ca* e *Ppp2r2d*) was increased following novelty exposure. *Bdnf* expression was increased in hippocampus during vigilance states marked by desynchronized brain electrical activity (waking and REM sleep). Hence, suggesting that *Bdnf* has a role as a homeostatic marker of sleep need. Here, we showed for the first time that exposure to novelty induces expression of protein phosphatase 2A (PP2A) coding genes (*Ppp2r2d, Ppp2r2ca*) in the hippocampus. Given PP2A role in activity dependant synaptic activity and its association to cytoskeleton proteins this could account for changes in neural activity and morphology observed after exposure to novelty. Finally, we found reinduction of synaptic potentiation related genes during REM sleep (*Egr1, Fos*). Furthermore, we also found reinduction of *Ppp2r2d*, which is related to synaptic depression. These results suggest the need for neural circuit reactivation during sleep and, for the first time, we provide experimental evidences that the synaptic potentiation and depression occur concurrently during sleep.

Keywords: MEMORY; LEARNING; SLEEP, GENE EXPRESSION; NEURONAL PLASTICITY.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos gerais para a indução e manutenção da Potencialização de Longa Duração (LTP) e Depressão de Longa Duração (LTD). 27

Figura 2 - Aparato para experimentação comportamental. 45

Figura 3 - Regiões do encéfalo do rato dissecadas para análise de expressão gênica por PCR em tempo real. 46

Figura 4 - Eletrodos cortical e hipocampal fixados ao soquete. 49

Figura 5 - Sistema para registro do potencial de campo local (PCL) e do comportamento animal. 50

Figura 6 - Características comportamentais e padrão do PCL hipocampal e cortical em cada um dos estados do ciclo sono vigília. 51

Figura 7 - Desenho experimental utilizado para identificar as alterações na expressão de genes relacionados à plasticidade após a exposição ao ambiente enriquecido. 53

Figura 8 - Controle de qualidade do mRNA extraído. 58

Figura 9 - Estabilidade média de expressão (M) dos genes selecionados como controles endógenos restantes durante a exclusão gradual dos controles endógenos com expressão menos estável. 59

Figura 10 - Seções frontais de 40 µm coradas por cresil-violeta (coloração de Nissl) mostrando o hipocampo dorsal direito dos quatro animais utilizados para a localização dos eletrodos. 60

Figura 11 - Tempo dos animais (em segundos) em cada estágio do ciclo sono vigília durante a última hora de registro pré-exposição; e durante a separação dos estados (últimos 35 min de registro). 61

Figura 12 - Hipnogramas dos animais dos grupos sono REM controle; sono REM exposto; sono de ondas lentas controle; sono de ondas lentas exposto; vigília controle e vigília exposto durante os últimos 40 min antes do sacrifício. 62

Figura 13 - Controle de qualidade do mRNA extraído. 63

Figura 14 - Expressão do gene *Arc* determinada por PCR em tempo real no hipocampo e córtex somestésico de ratos. 65

Figura 15 - Expressão do gene *Bdnf* determinada por PCR em tempo real no hipocampo e córtex somestésico de ratos. 68

Figura 16 - Expressão do gene *Camk4* determinada por PCR em tempo real no hipocampo e córtex somestésico de ratos..... 69

Figura 17 - Expressão do gene *Creb1* determinada por PCR em tempo real no hipocampo e córtex somestésico de ratos..... 70

Figura 18 - Expressão do gene *Egr1* determinada por PCR em tempo real no hipocampo e córtex somestésico de ratos. 71

Figura 19 - Expressão do gene *Egr2* determinada por PCR em tempo real no hipocampo e córtex somestésico de ratos. 72

Figura 20 - Expressão do gene *Fos* determinada por PCR em tempo real no hipocampo e córtex somestésico de ratos. 73

Figura 21 - Expressão do gene *Nr4a1* determinada por PCR em tempo real no hipocampo e córtex somestésico de ratos..... 74

Figura 22 - Expressão do gene *Ppp2ca* determinada por PCR em tempo real no hipocampo e córtex somestésico de ratos..... 75

Figura 23 - Expressão do gene *Ppp2r2d* determinada por PCR em tempo real no hipocampo e córtex somestésico de ratos..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos genes e respectivos ensaios *TaqMan* utilizados para análise de expressão gênica. 55

Tabela 2 - Estabilidade média de expressão dos controles endógenos. 64

Tabela 3 - Modulação na expressão de genes relacionados à plasticidade neural pelo fator experiência relevante no córtex somestésico e hipocampo de ratos. 66

Tabela 4 - Modulação na expressão de genes relacionados à plasticidade neural pelo fator estágio de sono no hipocampo de ratos. 66

Tabela 5 - Modulação na expressão de genes relacionados à plasticidade neural pelo fator estágio de sono no córtex somestésico de ratos. 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS[1]

5-HT_{3C}	receptor de serotonina 3C
A_1	receptor de adenosina A_1
A_{2a}	receptor de adenosina A_{2a}
Actb	actina, beta
AF-1	função ativadora 1
AMPA	α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato
Amphl	anfifisina II
ANOVA	análise de variância
AP-1	proteína ativadora 1
Arc	proteína associada ao citoesqueleto regulada por atividade
ATF-1	fator de transcrição ativador 1
B2m	Microglobulina, beta 2
Bdnf	fator neurotrófico derivado do encéfalo
CAMK2	proteína quinase dependente de Ca^{2+}/calmodulina II
CAMK4	proteína quinase dependente de Ca^{2+}/calmodulina IV
cAMP	adenosina monofosfato cíclica
CB1	receptor de canabinóide CB1
CBP	proteína ligada ao CREB
cDNA	DNA complementar
Clk	Clock
CREB	proteína ligante ao elemento responsivo do cAMP
Creb1	proteína ligante ao elemento responsivo do cAMP 1
Cttn	cortactina
CX	córtex somestésico
dCREB2b	proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP em 17A
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	potência na banda delta (delta power)
EA	exploração ativa (estágio do ciclo sono-vigília)

[1] As nomenclaturas e abreviações de genes e proteínas nesse trabalho seguem o proposto pelos International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice e Rat Genome and Nomenclature Committee (2009).

EEG	eletroencefalograma
Egr1	resposta de crescimento inicial 1
Egr2	resposta de crescimento inicial 2
ELK1	ELK1, membro da família de oncogenes ETS
EPM	erro padrão da média
EPSPs	potenciais excitatórios pós-sinápticos
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
F	fusos (estágio do ciclo sono-vigília)
Fos	oncogene osteosarcoma FBJ
Frap1	proteína de ligação ao FK506 12
FRP	formação reticular pontina
gDNA	DNA genômico
Gusb	Glucuronidase, beta
Homer1	gene homólogo ao Homer1 da Drosófila
HP	Hipocampo
Itpr1	receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo I
LED	light emission diode
LTD	depressão de longa duração
LTP	potencialização de longa duração
M	estabilidade média de expressão
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MEF2D	fator de crescimento do miócito 2D
mGLU	receptores metabotrópicos de glutamato
MOPr	receptor opióide Um
Mp	marcador de peso molecular
mRNA	RNA mensageiro
MV	movimentação estereotipada das vibrissas (estágio do ciclo sono-vigília)
NBRE	elemento responsivo ao fator de crescimento neural - clone B
NMDA	N-metil D-aspartato
Nr4a1	receptor nuclear subfamília 4, grupo A, membro 1
NSQ	núcleo supraquiasmático
NTC	controle sem amostra (non template control)

OC	grupo sono de ondas lentas controle
OE	grupo sono de ondas lentas exposto
p. ex.	por exemplo
PCL	potencial de campo local
pCREB	forma fosforilada de CREB
Per1	Period 1
Per2	Period 2
pERK2	forma fosforilada da quinase regulada por sinal extracelular
PGD_2	prostaglandina D_2
PGO	ondas ponto-genículo-occipitais
PI3 quinase	fosfatidil inositol 3 quinase
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PP1	proteína fosfatase 1
PP2A	proteína fosfatase 2A
PP2B	calcineurina
Ppp2ca	proteína fosfatase 2 (2A), subunidade catalítica, isoforma alfa
Ppp2r2d	proteína fosfatase 2 (2A), subunidade regulatória B, isoforma delta
Ppp3r1	proteína fosfatase 3, subunidade regulatória B, isoforma alfa (calcineurina B, tipo I)
RC	grupo sono REM controle
RE	grupo sono REM exposto
RNA	ácido ribonucleico
Rpl19	proteína ribossomal L19
rRNA	RNA ribossômico
RTK	receptor de tirosina quinase
SI	sono intermediário (estágio do ciclo sono-vigília)
SOL	sono de ondas lentas (estágio do ciclo sono-vigília)
SREM	sono REM (estágio do ciclo sono-vigília)
SRF	fator de resposta ao soro
STMN1	statmina 1
SYN1	sinapsina 1
TCF	fator complexo ternário

tws	Twins
UNG	uracil-N-glicosilase
VC	grupo vigília controle
VE	grupo vigília controle
VG	vigília (estágio do ciclo sono-vigília)
VP	vigília passiva (estágio do ciclo sono-vigília)
wdb	widerborst

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
µm/s	micrômetro por segundo
Ca^{2+}	íon cálcio
cm	centímetro
g	grama
h	hora
Hz	Hertz
kDa	kilodalton
M	molar
mg/kg	miligrama (da droga) por kilograma (peso animal)
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	micrômetro
mm	milímetro
mm	micrômetro
nm	nanômetro
pb	pares de bases
s	segundo
U	unidade
°C	grau Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar

SUMÁRIO

1. Introdução 21
1.1. Sono 21
1.2. Sono: estágios e regulação 22
1.2.1. O sono do rato 22
1.2.2. A regulação do ciclo sono-vigília 23
1.3. Funções do sono 24
1.4. Sono, aprendizado e plasticidade sináptica 25
1.4.1. Plasticidade sináptica dependente de atividade 25
1.4.2. Aprendizado, memória e sono 27
1.4.3. Alterações na transcrição e tradução durante o sono 30
1.4.3.1. ARC 30
1.4.3.2. BDNF 31
1.4.3.3. CAMK4 32
1.4.3.4. CREB 33
1.4.3.5. EGR1 34
1.4.3.6. EGR2 35
1.4.3.7. FOS 36
1.4.3.8. NR4A1 37
1.4.3.9. PP2A 38
1.4.3.10. Outros genes alterados 39
1.5. Duas teorias para a plasticidade sináptica durante o sono 40
2. Justificativa 42
3. Objetivos 43
3.1. Objetivo geral 43
3.2. Objetivos específicos 43
4. Métodos 44
4.1. Determinação dos controles endógenos 44
4.1.1. Análise do comportamento e coleta das regiões encefálicas 44
4.1.1.1. Animais 44
4.1.1.2. Aparato de experimentação comportamental 44
4.1.1.3. Delineamento experimental 45

4.1.1.4. Processamento do material 46
4.1.2. Expressão gênica 46
4.1.2.1. Extração do RNA e RT-PCR 46
4.1.2.2. Controle de qualidade 47
4.1.2.3. PCR em tempo real 47
4.2. Expressão gênica modulada por sono e ambiente enriquecido 48
4.2.1. Comportamento, cirurgia e coleta 48
4.2.1.1. Animais 48
4.2.1.2. Microeletrodos 48
4.2.1.3. Cirurgia para implante de microeletrodos 49
4.2.1.4. Aparato de experimentação comportamental 50
4.2.1.5. Identificação dos estados de sono-vigília 51
4.2.1.6. Treinamento comportamental 52
4.2.1.7. Causas de exclusão 53
4.2.1.8. Sacrifício e coleta 54
4.2.2. Expressão gênica 54
4.2.2.1. Extração do RNA e RT-PCR 54
4.2.2.2. Controle de qualidade 54
4.2.2.3. Seleção dos genes alvo 54
4.2.2.4. Curvas de eficiência dos ensaios de PCR em tempo real - 55
4.2.2.5. Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real 56
4.2.3. Análise estatística 56
4.3. Localização dos eletrodos 57
4.3.1. Animais, cirurgia e perfusão 57
4.3.2. Histoquímica 57
5. Resultados 58
5.1. Determinação dos controles endógenos 58
5.1.1. Controle de qualidade 58
5.1.2. Determinação dos controles endógenos 59
5.2. Posicionamento dos eletrodos 59
5.3. Expressão gênica modulada por sono e ambiente enriquecido 60
5.3.1. Identificação e separação dos estágios do ciclo sono-vigília 60
5.3.2. Controle de qualidade 63
5.3.3. Detecção de outliers 64

5.3.4. Expressão gênica 64
5.3.4.1. *Arc* 64
5.3.4.2. *Bdnf* 67
5.3.4.3. *Camk4* 68
5.3.4.4. *Creb1* 69
5.3.4.5. *Egr1* 70
5.3.4.6. *Egr2* 71
5.3.4.7. *Fos* 72
5.3.4.8. *Nr4a1* 73
5.3.4.9. *Ppp2ca* 74
5.3.4.10. *Ppp2r2d* 75
6. Discussão 77
6.1. Exposição ao ambiente enriquecido e a expressão de genes relacionados à plasticidade 77
6.2. A expressão de *Bdnf* é modulada pelo sono 78
6.3. A plasticidade sináptica está alterada durante o sono 78
7. Conclusão 83
8. Referências 84
Anexos 101