



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


Gabriela de Oliveira Skinner

**Efeitos da privação de sono paradoxal na resposta inflamatória de ratos e avaliação do efeito antinociceptivo do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-lipoxinas**

Rio de Janeiro  
2012

Gabriela de Oliveira Skinner

**Efeitos da privação de sono paradoxal na resposta inflamatória de ratos e avaliação do efeito antinociceptivo do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-lipoxinas**



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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Iolanda Margherita Fierro

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Olga Maria Martins Silva de Almeida

Rio de Janeiro

2012

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

S628 Skinner, Gabriela de Oliveira.  
Efeitos da privação de sono paradoxal na resposta inflamatória de ratos e avaliação do efeito antinociceptivo do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-lipoxinas / Gabriela de Oliveira Skinner. 99 f. : il.

Orientador: Iolanda Margherita Fierro.  
Coorientadora: Olga Maria Martins Silva de Almeida.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-Graduação em Biociências.

1. Sono – Privação – Teses. 2. Inflamação – Aspectos imunológicos – Teses. 3. Hiperalgesia – Teses. 4. Lipoxinas - Teses. I. Fierro, Iolanda Margherita. II. Almeida, Olga Maria Martins Silva de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.8-009.836:612.017

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

---

Assinatura

---

Data

Gabriela de Oliveira Skinner

**Efeitos da privação de sono paradoxal na resposta inflamatória de ratos e avaliação do efeito antinociceptivo do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-lipoxinas**

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

Aprovada em 28 de março de 2012.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Iolanda Margherita Fierro  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Farias Benjamim  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Monica Santos Rocha  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Katia Costa de Carvalho Sabino  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Thereza Christina Barja-Fidalgo  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2012

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao futuro que está por vir. Que o final que ela representa, seja apenas o início de uma vida repleta de asteriscos e resultados fantásticos!!

## AGRADECIMENTOS

À Deus e todos os meus anjinhos que lá de cima iluminam os meus caminhos e me protegem.

Às minhas orientadoras que eu tanto admiro, Prof<sup>a</sup> Olga e Prof<sup>a</sup> Iolanda por todos esses anos de orientação, não só científica, mas da vida! Obrigada por toda dedicação, apoio, incentivo e principalmente por confiarem em mim e no meu trabalho. Espero ter retribuído à altura. Vocês moram no meu coração! Muito obrigada!!!

À Dr<sup>a</sup>. Simone Vargas da Silva, a Si, pela imensa generosidade. Pela ajuda incessante na realização de praticamente todos os experimentos desta tese. Obrigada pela ajuda de sempre! Comecei o doutorado te devendo alguns chopps, e tenho certeza que terminei te devendo alguns barris!!

À Dr<sup>a</sup>. Katia Sabino pelas sugestões e cuidadosa revisão deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Thereza Christina Barja-Fidalgo e todos os amigos queridos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Celular que me receberam com todo carinho e sempre me fizeram sentir parte deste grupo. Simone, Vany, Andrezinho, Rafael, Edward, Cris, Fernandinha, Heitor, Roberta, Pedro, João, Mariana, Amendola, Carol, Genilson, Renatinhas, Andreza. Muito obrigada!!!

Ao Prof Frank e Prof<sup>a</sup> Penha pelos anos de convivência, mas principalmente por sempre estarem dispostos a colaborar e enriquecer cientificamente, ou não, nossas conversas! Obrigada pelos ensinamentos! Além de muita ciência aprendi um montão de receitas!!!

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Jorge, Tiagão, Aline, Michael, Gabizinha, Alan, Suelen, Carol, André, Everton, Leo, Guedes, Marta, Priscila, por proporcionarem um ambiente de trabalho sempre agradável e divertido.

Aos quatro horrorosos que eu mais adoro, pelas risadas mais gostosas, pelas discussões mais toscas, pelas terças em dobro Domino's, por dividirem comigo meus momentos de gordinha! Paulo Cesar, Bruninha, Luiz e Bela vocês são muito especiais! Espero que tenham ouvido direitinho todos os meus conselhos! Estou torcendo por vocês! Sempre!

À Mariana, Cristiane e Nelcir por todo cuidado dispensado aos nossos animais, e por sempre quebrarem meus galhos arrumando mais ratinhos quando eu precisei!

À minha família, mamãe Solange, Gui, Carol, porque vocês são tudo pra mim! Meu maior orgulho! O velho deve estar todo prosa da gente!

À Alessandra porque ela já faz parte da família! Obrigada por todo carinho de sempre comigo e com meus bichanos Migui e Totti.

Ao Fabio Damasceno, a minha melhor dupla na ciência e na vida. À família que estamos construindo juntos. Eu não poderia ter feito escolha melhor! Você foi essencial em todos os momentos! À você o meu eterno amor, carinho e gratidão! Simples e sincero assim!! ;) Te amo!

Você pode encarar um erro como uma besteira a ser esquecida, ou um resultado que aponta uma nova direção.

*Steve Jobs*



## RESUMO

SKINNER, Gabriela de Oliveira. *Efeitos da privação de sono paradoxal na resposta inflamatória de ratos e avaliação do efeito antinociceptivo do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-lipoxinas*. 2012. 99f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Sono e imunidade parecem apresentar uma relação de reciprocidade. A ativação do sistema imune altera o padrão de sono e distúrbios do sono podem afetar a função imune. Além disso, é bem descrito que a privação de sono paradoxal (PSP) leva à hiperalgesia e o tratamento com fármacos clássicos, como opióides ou antidepressivos tricíclicos, não é capaz de reverter este quadro. Neste trabalho, avaliamos se a PSP afetaria a resposta inflamatória e a sobrevida em ratos e se o tratamento com um análogo sintético de lipoxinas (ATL-1) seria capaz de reverter a hiperalgesia induzida pela PSP. Todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais, da UERJ (CEUA/032/2010). Ratos Wistar machos foram submetidos a 96 h de PSP, induzidas pelo método de plataforma única (PU) ou de múltiplas plataformas modificado (MPM). Após 96 h de PSP os animais foram submetidos ao modelo da bolha de ar ou pleurisia utilizando-se a carragenina como agente flogístico, ou ainda a PSP foi aplicada antes ou após a indução de um modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP). Quatro horas após a injeção de carragenina os animais apresentaram um aumento no recrutamento de leucócitos para a cavidade da bolha, porém não houve diferença entre animais PSP e controles. O número total de leucócitos no plasma não se alterou após a injeção de carragenina. Na pleurisia, os animais PSP apresentaram um aumento nos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no plasma, enquanto apenas IL-1 $\beta$  e IL-6 estavam aumentados no exsudato pleural dos animais que receberam carragenina. O padrão de recrutamento de leucócitos para o local da injúria foi bastante semelhante entre os animais controle e PSP 2 h, 4 h e 24 h após a injeção de carragenina. Houve um aumento progressivo com o tempo, apresentando um pico em 24 h, no entanto, não foi observada diferença significativa na resposta dos grupos PSP. A PSP aplicada antes ou após a indução do CLP reduziu a sobrevida dos animais, mas não alterou o acúmulo de neutrófilos, nos dois protocolos. Quando a PSP foi aplicada antes do CLP, os níveis séricos de IL-6 estavam aumentados nos grupos PSP e PSP<sub>CLP</sub>, porém quando a PSP foi aplicada após o CLP, ambas IL-6 e IL-1 $\beta$  estavam aumentadas nos grupo PSP<sub>CLP</sub>. O efeito do tratamento com ATL-1 (10  $\mu$ g/kg, i.v.) na hiperalgesia induzida pela PSP foi determinado através do teste da formalina. O análogo reduziu o número de comportamentos relacionados à dor em animais PSP e controles na fase inflamatória do teste. Nossos resultados demonstraram que a PSP por 96 h aumentou os níveis plasmáticos de citocinas, reduziu a sobrevida dos animais, contudo não foi capaz de alterar o recrutamento de leucócitos frente a um estímulo inflamatório ou infeccioso. O aumento de mediadores inflamatórios observado nesses animais pode estar relacionado à hiperalgesia em animais PSP, uma vez que o tratamento com o ATL-1 reverteu esse efeito, possivelmente através de mecanismos envolvendo sua ação anti-inflamatória.

Palavras-chave: Privação de sono paradoxal. Resposta inflamatória. Dor. Lipoxinas.

## ABSTRACT

Sleep and immunity show a reciprocal relationship. Immune system activation alters sleep pattern and sleep disturbances can affect immune function. Moreover, it is well known that paradoxical sleep deprivation (PSD) leads to hyperalgesia and the treatment with classical drugs like opioids or tricyclic antidepressants is not able to reverse this hyperalgesia. In this work we investigated whether PSD could affect inflammatory response and survival in rats and if ATL-1 treatment would be able to reverse the hyperalgesia induced by PSD. All experimental protocols were previously approved by The Animal Care Ethical Committee of UERJ (CEUA/032/2010). Male Wistar rats were submitted to 96 h of PSD by single platform or modified multiple platforms methods. After 96 h of PSD animals were submitted to carrageenan-induced air pouch or pleurisy, or PSD was induced prior or after cecal ligation and puncture model (CLP). Animals presented an increase in leukocyte recruitment to the pouch cavity 4 h after carrageenan injection, however there was no difference between PSD and controls. The number of plasma leukocyte did not change after carrageenan injection. PSD animals submitted to pleurisy showed an increase in IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  plasma levels, while IL-1 $\beta$  and IL-6 were increased in pleural exsudate of animals that received carrageenan. Leukocyte recruitment pattern to the site of injury was similar between controls and PSD 2 h, 4 h and 24 h after carrageenan injection. There was a progressive increase with time, reaching the maximum point at 24 h, but no differences were observed in PSD groups. PSD induced prior or after CLP decreased animals survival, however no difference was observed on neutrophil accumulation in both protocols. When PSD was induced prior CLP, IL-6 plasma levels were increased in PSD e PSD<sub>CLP</sub> groups, when PSD was induced after CLP, IL-6 and IL-1 $\beta$  plasma levels were increased in PSD<sub>CLP</sub> group. The effect of ATL-1 treatment (10  $\mu$ g/kg, i.v.) on hyperalgesia induced by PSD was determined through formalin test. The treatment reduced the number of pain related behaviors in PSD animals and controls on inflammatory phase. Our results show that ATL-1 was able to revert the hyperalgesia induced by PSD possibly through its anti-inflammatory action. Furthermore, PSD for 96 h increased cytokine plasma levels and reduced survival, however it was not able to modify leukocyte recruitment when challenged by an inflammatory or infectious stimulus. However the inflammatory mediators increase observed in PSD animals could be related to hyperalgesia since treatment with ATL-1 reverted this effect, possibly through anti-inflammatory mechanisms

Keywords: Paradoxical sleep deprivation. Inflammatory response. Pain. Lipoxins.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sinais fisiológicos característicos de cada uma das fases do ciclo sono-vigília de humanos.....	18
Figura 2. Ilustração representando um hipnograma obtido de uma noite inteira de sono.....	20
Figura 3. Processo de migração de neutrófilos e eliminação de agentes infecciosos.....	30
Figura 4. Figura ilustrando o tanque utilizado na técnica de MPM para a privação de sono paradoxal.....	42
Figura 5. Figura ilustrando o aparato utilizado na técnica de PU para a privação de sono paradoxal.....	42
Figura 6. Figura ilustrativa do procedimento de obtenção da cavidade no modelo da bolha de ar.....	43
Figura 7. Figura ilustrativa do momento da injeção intratorácica de carragenina.....	44
Figura 8. Fotografias ilustrando o procedimento do CLP.....	45
Figura 9. Fotografia ilustrando o aparato utilizado para observação comportamental durante o teste da formalina.....	48
Figura 10. Esquemas representando os desenhos experimentais utilizados neste trabalho.....	50
Figura 11. Número de leucócitos no lavado da bolha de ar 4 h após a administração de carragenina em ratos PSP através da técnica de MPM.....	53
Figura 12. Contagem diferencial dos leucócitos presentes no lavado da bolha de ar em ratos PSP através da técnica de MPM.....	54
Figura 13. Número de leucócitos sanguíneos em ratos PSP, através da técnica de MPM, 4 h após a administração de carragenina na bolha de ar.....	54
Figura 14. Caracterização da resposta inflamatória de animais PSP, através da técnica de PU, submetidos ao modelo da bolha de ar.....	56
Figura 15. Curso temporal da resposta inflamatória de animais PSP por 96 h, através da técnica de MPM, submetidos à pleurisia induzida por carragenina.....	57

Figura 16. Quantificação dos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ no plasma de animais PSP submetidos ao modelo da pleurisia 4 h após a injeção de carragenina.....	58
Figura 17. Quantificação dos níveis de IL-6 e IL-1 $\beta$ no exsudato pleural de animais PSP submetidos ao modelo da pleurisia 4 h após a injeção de carragenina.....	59
Figura 18. Efeito da PSP aplicada antes da sepse na sobrevida e na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, 6 h e 24 h após a indução do CLP.....	60
Figura 19. Dosagens plasmáticas dos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ em animais PSP por 96 h e posteriormente submetidos ao CLP.....	62
Figura 20. Efeito da PSP, aplicada após a sepse, na sobrevida e na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal 24 h após a PSP.....	64
Figura 21. Dosagens plasmáticas dos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ em animais submetidos ao CLP e posteriormente PSP por 24 h.....	65
Figura 22. Número de comportamentos relacionados à dor após injeção intraplantar de formalina em animais controles e PSP tratados ou não com ATL-1 (10 $\mu$ g/kg, i.v.) durante um período de 45 minutos de observação.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AA - ácido araquidônico
- ATL – *aspirin triggered lipoxins*
- BSA – albumina de soro bovino, *bovine serum albumin*
- CINC - citocina indutora de quimiotaxia em neutrófilos, *cytokine-induced neutrophil chemoattractant*
- CLP – ligação e perfuração do ceco, *cecal ligation and puncture*
- COX-2 – ciclooxygenase-2
- CTRL – grupo controle
- EEG - eletroencefalograma
- EMG - eletromiograma
- EOG - eletrooculograma
- ERK – quinase regulada por sinal extracelular, *extracellular signal regulated kinase*
- HMGB1 – proteína do grupo de alta mobilidade B1, *high mobility group box protein 1*
- HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
- IL - interleucina
- LO - lipoxigenase
- LPS - lipopolissacarídeo
- LXs - lipoxinas
- MIF – fator de inibição da migração de macrófagos, *macrophage migration inhibitory factor*
- NF- $\kappa$ B – fator nuclear  $\kappa$ B, *nuclear factor -  $\kappa$ B*
- NK – célula *natural killer*
- NO – óxido nítrico
- NREM – sono não-REM
- PBS – salina tampão fosfato
- MPM – técnica de múltiplas plataformas modificada
- PSP – privação de sono paradoxal/privado de sono paradoxal
- PU – técnica de plataforma única
- REM – rapid eye movements
- SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica, *systemic inflammatory response syndrome*
- SNC – sistema nervoso central
- TNF – fator de necrose tumoral, *tumor necrosis factor*

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>SONO</b> .....	17
1.1	<b>Sono não- REM</b> .....	18
1.2	<b>Sono REM ou paradoxal</b> .....	21
1.3	<b>Privação de sono</b> .....	22
1.4	<b>Privação de sono paradoxal</b> .....	23
1.4.1	<u>Técnica de privação de sono paradoxal</u> .....	24
1.5	<b>Sono e sistema imune</b> .....	25
1.5.1	<u>O sistema imune influenciando o sono</u> .....	26
1.5.2.	<u>O sono influenciando o sistema imune</u> .....	27
2	<b>INFLAMAÇÃO</b> .....	29
3	<b>SEPSE</b> .....	32
4	<b>DOR</b> .....	34
5	<b>LIPOXINAS</b> .....	38
6	<b>OBJETIVOS</b> .....	40
6.1	<b>Objetivo geral</b> .....	40
6.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	40
7	<b>METODOLOGIA</b> .....	41
7.1	<b>Animais</b> .....	41
7.2	<b>Modelos Experimentais</b> .....	41
7.2.1	<u>Privação de sono paradoxal</u> .....	41
7.2.1.1	Técnica de múltiplas plataformas modificada (MPM).....	41
7.2.1.2	Técnica de plataforma única (PU).....	42
7.2.2	<u>Modelo da bolha de ar (<i>air pouch</i>)</u> .....	43
7.2.3	<u>Pleurisia</u> .....	43
7.2.4	<u>Indução da sepse por CLP</u> .....	44
7.3	<b>Obtenção do sangue e do lavado</b> .....	45
7.3.1	<u>Bolha de ar (<i>air pouch</i>)</u> .....	45
7.3.2	<u>Pleurisia</u> .....	46
7.3.3	<u>CLP</u> .....	46
7.4	<b>Quantificação das células do sangue e do lavado</b> .....	46

7.4.1	<u>Contagem celular total</u> .....	46
7.4.2	<u>Contagem celular diferencial</u> .....	47
7.5	<b>Dosagem citocinas</b> .....	47
7.6	<b>Análise Comportamental</b> .....	48
7.6.1	<u>Administração do ATL-1</u> .....	48
7.6.2	<u>Teste da formalina</u> .....	48
7.7	<b>Desenho experimental</b> .....	49
7.7.1	<u>Bolha de ar</u> .....	49
7.7.2	<u>Pleurisia</u> .....	49
7.7.3	<u>CLP</u> .....	49
7.7.4	<u>Teste da formalina</u> .....	50
7.8	<b>Análise estatística</b> .....	52
8	<b>RESULTADOS</b> .....	53
8.1	<b>Caracterização da resposta inflamatória de animais privados de sono paradoxal submetidos ao modelo da bolha de ar</b> .....	53
8.1.1	<u>PSP induzida pela técnica de MPM</u> .....	53
8.1.2	<u>PSP induzida pela técnica de PU</u> .....	54
8.2	<b>Caracterização da resposta inflamatória de animais privados de sono paradoxal submetidos ao modelo da pleurisia</b> .....	55
8.3	<b>Efeito da PSP na sobrevivência, acúmulo de neutrófilos no exsudato e níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias em animais submetidos ao CLP</b> .....	59
8.4	<b>Efeito do tratamento agudo com ATL-1 na hipernocicepção induzida por 96 h de PSP no teste da formalina</b> .....	66
9	<b>DISCUSSÃO</b> .....	68
10	<b>CONCLUSÕES</b> .....	81
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	82

## INTRODUÇÃO

Diversos estudos epidemiológicos têm estabelecido que uma quantidade adequada de horas de sono é necessária para uma boa saúde e um bom funcionamento orgânico. No entanto, um número cada vez maior de pessoas vem experimentando a privação e/ou restrição de sono.

De acordo com dados do *National Institutes of Health* aproximadamente 70 milhões de pessoas nos Estados Unidos sofrem de distúrbios crônicos de sono ou problemas intermitentes com sono (NHLBI, 2003). O número de pessoas que relataram problemas com sono aumentou 13% desde 2001. Nos últimos oito anos o número de norte americanos que dormem menos de seis horas por noite passou de 13% para 20% e aqueles que relataram dormirem oito horas ou mais passou de 38% para 28% (*National Sleep Foundation*, 2009). No entanto aproximadamente 40% dos norte americanos concordam que o sono é tão importante para uma boa saúde quanto uma alimentação saudável e a prática do exercício físico (*National Sleep Foundation*, 2009).

Um estudo epidemiológico realizado pelo Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) mostrou que, em 1995, 27,6% (1,7 milhões) dos habitantes de São Paulo reclamavam de dificuldades em manter o sono (Pires e col., 2007). Além disso, 32,8% da população apresentam síndrome da apneia obstrutiva do sono (Bitencourt e col., 2009).

Fatores sócio-econômicos influenciam de maneira importante na quantidade de horas dedicadas ao sono (Patel e col., 2006; Patel, 2007; Stamatakis e col., 2007). A necessidade da economia em aumentar os níveis de produtividade leva os indivíduos a trabalharem por muitas horas. Além disso, a forte influência do lazer e do entretenimento, através da televisão, internet e da prática cultural, também contribuem para que os indivíduos iniciem o sono cada vez mais tarde, gerando assim episódios de restrição e/ou privação de sono.

A privação de sono é considerada um fator de risco à saúde que contribui com muitos processos patológicos, reduzindo a longevidade. Além disso, os efeitos da privação do sono são cumulativos, de tal forma que uma leve redução no sono por noite, pode, durante um período de tempo, resultar em déficit funcional significativo.



Dentre as várias funções comportamentais e fisiológicas influenciadas pelo sono podemos destacar a função imunológica. Acredita-se que a relação entre sono e função imune seja de reciprocidade. Essa relação baseia-se na letargia e forte sonolência que ocorre durante infecções e condições inflamatórias e na maior suscetibilidade a infecções como consequência da privação do sono.

Vários parâmetros do sistema imune celular e humoral têm sido investigados por sua associação com a privação de sono, porém os resultados têm se mostrado inconsistentes e contraditórios. Portanto, novos estudos para avaliação dos níveis de marcadores inflamatórios na privação total ou de fases específicas de sono, além de uma caracterização da resposta inflamatória em consequência a períodos de privação de sono, possibilitariam uma melhor compreensão da relação entre sono e sistema imune.

## 1 SONO

Dedicamos aproximadamente um terço de nossas vidas ao sono. É um estado funcional cíclico, com manifestações comportamentais caracterizadas por imobilidade relativa e aumento do limiar de respostas aos estímulos externos, variações de parâmetros biológicos e da atividade mental (Buela, 1990; Hobson, 1999; Martins e col., 2001) Uma importante característica do sono que o diferencia de outros estados de alteração da consciência é que ele é facilmente reversível (Hobson, 1999).

Assim como muitas atividades comportamentais e fisiológicas o ciclo sono-vigília também apresenta periodicidade circadiana (Rechtschaffen e Siegel, 2000). A estrutura neuronal responsável pela organização temporal de vários ritmos biológicos que incluem o ciclo sono-vigília, atividade locomotora, temperatura corporal, comportamento de consumo de água e alimento, o ritmo de secreção hormonal e de peptídeos, é o núcleo supraquiasmático do hipotálamo anterior (Reinoso-Suarez e col., 2001).

O controle destes ritmos por este núcleo hipotalâmico pode ser comprovado por dois tipos de estudos. Estudos de lesão no núcleo supraquiasmático, que levaram a uma ausência de ritmicidade na expressão destes vários ritmos biológicos, e estudos de transplante de células do núcleo supraquiasmático, que foram capazes de restabelecer a ritmicidade de alguns destes ritmos. Contudo, ainda não está claro qual é o mecanismo pelo qual este núcleo realiza a organização temporal destes ritmos (LeSauter e Silver, 1998).

Várias teorias têm sido propostas para explicar a importância do sono, como a conservação da energia metabólica, capacitação intelectual, termorregulação e armazenamento de memória, embora nenhuma consiga definir ou integrar todas as informações disponíveis sobre o sono. Sua importância fisiológica é, contudo, evidenciada pela persistência ao longo da evolução de mamíferos e aves e pelo enfraquecimento funcional observados, podendo levar até a morte em animais experimentais (Rechtschaffen e col., 1983; Rechtschaffen e Siegel, 2000).

Alguns trabalhos têm mostrado evidências da relação entre o sono e o processamento da memória (Walker e Stickgold, 2006). Esses estudos têm sido especificamente direcionados ao papel do sono na codificação, consolidação e reconsolidação da memória e plasticidade cerebral, confirmando a hipótese de que o

sono contribui de forma importante para o processo de memória e plasticidade cerebral (Stickgold, 2005; Walker e Stickgold, 2006).

O ciclo sono-vigília de mamíferos apresenta três fases distintas do ponto de vista neurofisiológico e comportamental: vigília, sono REM (*rapid eye movements*) e sono não-REM (NREM) (Jouvet, 1962). Essas fases podem ser facilmente identificadas e caracterizadas através da monitorização simultânea do eletroencefalograma (EEG), do eletrooculograma (EOG) e do eletromiograma de superfície (EMG) da região submentoniana (queixo) durante o exame de polissonografia. O EEG permite avaliar a atividade elétrica de neurônios corticais, o EOG registra os movimentos oculares e o EMG registra a atividade muscular (Fig. 1) (Rechtschaffen e Kales, 1968).

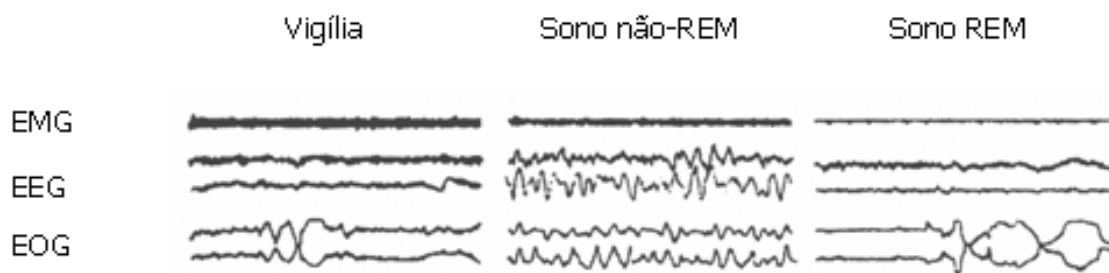


Figura 1: Sinais fisiológicos característicos de cada uma das fases do ciclo sono-vigília de humanos. EMG: eletromiograma, EEG: eletroencefalograma, EOG: eletrooculograma. (Adaptada de Hobson e Pace-Schott, 2002)

### 1.1 Sono não-REM (NREM)

Durante o sono NREM os parâmetros fisiológicos apresentam uma variação menor quando comparados à vigília e ao sono REM. Ocorre progressiva redução da atividade elétrica cortical e a taxa metabólica está em seu ponto mais baixo. As frequências cardíaca e respiratória tendem a ser baixas e mais regulares; os músculos estão relaxados, embora o tônus muscular esteja presente em toda a extensão do estágio NREM. Os movimentos oculares são raros, exceto os movimentos oculares lentos do início do sono. Quando o sujeito é acordado durante este estágio, tipicamente relata pensamentos fragmentados, cenas ou imagens vagas ou sem atividade mental (Baker, 1985; Hobson, 1990).

A fase NREM é convencionalmente subdividida em quatro diferentes estágios baseados em suas características eletroencefalográficas. À medida que os estágios se sucedem o sono torna-se cada vez mais profundo.

Durante a vigília tranquila observa-se um período de atividade elétrica  $\alpha$  (8 a 13Hz) e/ou uma baixa voltagem, apresentando o EEG deste estágio uma frequência mista, acompanhado por alta atividade eletromiográfica e frequentes movimentos oculares voluntários (Carskadon e Rechtschaffen, 2000).

O estágio 1 do sono NREM, também conhecido como “estágio de transição” ou “meio sono”, representa uma transição da vigília para o sono e se estabelece durando em média de um a sete minutos (Baker, 1985; Lavie, 1996). É caracterizado por um EEG de baixa amplitude e frequência mista (2 a 7 Hz). A atividade do EMG é normalmente mais alta do que nos outros estágios do sono, mas a amplitude pode variar muito. O EOG mostra, às vezes, movimentos oculares lentos. Este estágio representa até 5% do tempo total de sono (Rechtschaffen e Kales, 1968; Pinto Júnior, 2000).

O estágio 2 do sono NREM é reconhecido por uma atividade de baixa voltagem e frequências variadas apresentando episódios de ondas de alta voltagem. Este estágio normalmente constitui a maior proporção do sono nos humanos adultos, 45 a 55% do tempo total (Rechtschaffen e Kales, 1968; Baker, 1985).

O estágio 3 do sono NREM é classificado quando ocorre o aparecimento de ondas lentas ou ondas  $\delta$  ( $\leq 2$  Hz) de alta amplitude em 20 a 50% do registro. O EMG normalmente demonstra baixa atividade e os movimentos oculares estão ausentes, mas estes critérios não são relevantes para a classificação (Rechtschaffen e Kales, 1968).

O estágio 4 do sono NREM é semelhante quanto ao EEG, EMG e EOG do estágio anterior, entretanto, é caracterizado pela presença de ondas  $\delta$  em mais de 50% do registro (Rechtschaffen e Kales, 1968).

Os estágios 3 e 4 do sono NREM são frequentemente combinados, visto que diferem somente na proporção de ondas lentas no EEG, e são coletivamente denominados de sono de ondas lentas ou sono delta. Durante a parte inicial da noite o estágio 3 normalmente aparece como um estágio de transição entre o estágio 2 e 4. Na maioria dos adultos sob condição normal, o estágio 4 do sono NREM é observado principalmente no primeiro terço da noite, enquanto a maioria do sono

NREM no final da noite é o estágio 3 (Baker, 1985). O estágio 3 do sono NREM tipicamente constitui até 8% do tempo total de sono; e o estágio 4 até 15% do tempo total de sono (Pinto Júnior, 2000).

Durante uma noite de sono as fases REM e NREM se alternam de maneira cíclica (Fig. 2). Logo após o início do sono, os registros do EEG mostram uma rápida progressão para o estágio quatro da fase NREM que persiste por aproximadamente trinta minutos (Dement e Kleitman, 1957). Em seguida, coincidindo com movimentos corporais, o registro do EEG começa a mostrar pequenos períodos dos estágios três, dois e um, seguido pelo início da fase REM. Essa sequência se repete ciclicamente por toda noite em intervalos de noventa a cem minutos (de um episódio REM a outro), acontecendo de quatro a seis ciclos por noite.

O sono NREM parece ser a fase na qual a energia é conservada e o sistema nervoso central, assim como outros sistemas, é capaz de se recuperar da atividade de episódios anteriores de vigília ou se preparar para o próximo episódio.

Com a progressão da noite os episódios REM vão se tornando mais longos, enquanto os episódios NREM mais curtos e menos frequentes (Dement e Kleitman, 1957; McCarley e Massaquoi, 1986).

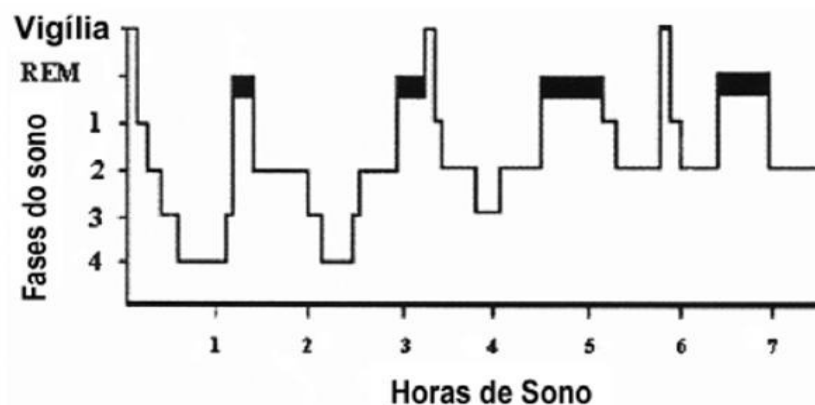


Figura 2: Ilustração representando um hipnograma obtido de uma noite inteira de sono. A ilustração mostra a alternância entre as fases NREM e REM (Adaptada de Palma e col., 2007).

## 1.2 Sono REM ou sono paradoxal

O termo REM (*rapid eye movement*) foi dado em função da presença de movimentos oculares rápidos observados durante essa fase de sono (Aserinsky e Kleitman, 1953). Os registros do EEG durante essa fase apresentam semelhanças ao observado durante a vigília e por isso Dement (1958) utilizou o termo “sono ativo” para definir essa mesma fase.

Jouvet e Michel (1959) mostraram em gatos, e Berger (1961) em humanos que a perda do tônus muscular nos músculos antigravitacionais é uma das características dessa fase de sono. A atonia muscular é mais intensa nos músculos do pescoço, mas afeta todos os principais grupos musculares. Os músculos intercostais apresentam uma significativa redução em sua atividade, mas sem afetar o tônus do diafragma, porém este tem sua atividade aumentada para compensar a perda dos outros músculos (Jouvet, 1967; Culebras, 2005).

Jouvet e colaboradores (1959) chamaram essa fase de sono paradoxal, pois durante o período de sono REM os registros do EEG apresentavam atividade cortical enquanto os registros do EMG perda do tônus muscular. Para eles essa fase apresentava, ao mesmo tempo, características comportamentais presentes no estado de sono profundo e no estado de consciência.

O sono REM é acompanhado por uma série de alterações fisiológicas. Observa-se um alto grau de ativação autonômica, incluindo frequências cardíaca e respiratória elevadas e irregulares e elevações da pressão arterial (Rechtchaffen e Kales, 1968).

Neste estágio do sono o fluxo sanguíneo cerebral atinge valores mais altos do que em qualquer outro estágio. Observa-se, ainda, aumento na temperatura cerebral e maior consumo de oxigênio durante esta fase. O sistema de termorregulação é suspenso, pois os mecanismos de transpiração, tremor, vasodilatação, vasoconstrição e taquipnéia térmica estão relativamente inativos ou ausentes. Parmeggiani e Rabini (1967) foram os primeiros a descrever a perda do controle termorregulatório durante o sono REM. Ocorre um aumento da troca de calor entre a pele e o meio ambiente, fortemente influenciado pela temperatura sanguínea. A temperatura corporal tende a atingir a temperatura do ambiente (Wehr, 1992).

Outra característica fisiológica em homens é a ocorrência da tumescência peniana durante os episódios de sono REM (Baker, 1985; Carskadon e

Rechstchaffen, 2000). De acordo com a maioria dos autores, o sono REM é a fase em que ocorrem os mais ricos e mais bem estruturados sonhos (Reinoso-Suarez e col., 2001). Quando os sujeitos adultos são acordados durante o sono REM, são capazes de recordar o conteúdo dos sonhos em mais de 70% dos eventos. Hobson (1990) sugere que essas observações indicam que o sonho é um fenômeno associado com a ativação do cérebro no sono REM. Abalos musculares vistos no sono REM podem ser relacionados às imagens mentais dos sonhos (Carskadon e Rechstchaffen, 2000). Normalmente, o sono REM constitui cerca de 20 a 25% do tempo total de sono nos indivíduos adultos (Pinto Júnior, 2000).

### 1.3 Privação de sono

A prevalência de distúrbios do sono está aumentando nas sociedades modernas, onde a constante exposição à luz artificial e o grande número de atividades interativas, como a televisão e a internet, combinadas à pressão econômica e social tem feito com que as pessoas diminuam cada vez mais o tempo investido com sono. Muitos indivíduos podem ser cronicamente privados de sono como resultado de seu estilo de vida (Miro e col., 2002; Tufik e col., 2009).

A privação de sono é considerada um fator de risco à saúde que contribui com muitos processos patológicos, reduzindo a longevidade. Além disso, os efeitos da privação do sono são cumulativos, de tal forma que uma leve redução no sono por noite, pode, durante um período de tempo, resultar em um déficit funcional significativo (Spiegel e col., 1999; Belenky e col., 2003).

Normalmente o que se pode observar entre a maioria das pessoas é uma restrição de sono durante a semana. Essa restrição leva a um débito de sono, que será compensado aumentando as horas de sono nos finais de semana. Durante essas noites observa-se uma alta eficiência do sono, com baixa latência de início do sono e um aumento na duração dos estágios 3 e 4 do sono NREM. No entanto, o despertar tardio após essas noites de “recuperação” leva a um atraso de fase no dia seguinte que é frequentemente seguido por um despertar cedo no início da semana. A duração do sono é consideravelmente reduzida e a privação de sono se inicia novamente (Shneerson, 2000).

Dados epidemiológicos da *National Sleep Foundation* estimaram que a população norte americana reduziu em 20% o tempo gasto com sono e a qualidade desse sono ao longo das últimas décadas (*National Sleep Foundation*, 2002, 2006).

Uma das formas de se estudar e compreender as propriedades funcionais do sono é através da observação das modificações produzidas em consequência da privação de sono. Experimentos realizados em roedores demonstraram que a privação de sono pode ser letal (Rechtschaffen e col., 1983). Ratos submetidos a longos períodos de privação de sono exibiram diversas alterações, especialmente em sistemas fisiológicos envolvidos com a regulação do metabolismo, termogênese e imunidade (para revisão ver Dinges e Chugh, 1997; Rechtschaffen e col., 2002). Todos esses dados corroboram a necessidade do sono para a manutenção da saúde e a sobrevivência.

Enquanto o sono influencia diversos sistemas fisiológicos, como a memória e a capacidade cognitiva (Belenky e col., 2003; Van Dongen e col., 2003 e 2004; Durmer e Dinges, 2005; Dorrian e Dinges, 2005;), a secreção de hormônios como a melatonina e o cortisol, o metabolismo da glicose (Van Cauter e col., 1997; Spiegel e col., 1999 e 2004) a função imunológica, a temperatura corporal e a função renal (Luboshitzky 2000; Unruh e col., 2011), a privação de sono, conseqüentemente, pode afetar tanto funções comportamentais quanto fisiológicas (Dinges e Chugh 1997; Van Cauter e col., 2007).

#### **1.4 Privação de sono paradoxal**

O padrão de sono da população tem sido drasticamente alterado em função de razões econômicas e sociais. A maioria dos episódios de privação de sono na população moderna ocorre, em geral, durante a fase paradoxal. Isso se deve principalmente ao estilo de vida atual que tem feito com que as pessoas durmam cada vez mais tarde, em função da pressão econômica e compromissos sociais impostos por um estilo de vida extremamente agitado, e acordem cada vez mais cedo. Como os episódios de sono paradoxal ocorrem com maior frequência na segunda metade da noite, essa fase é preferencialmente prejudicada.

A privação de sono paradoxal (PSP) propicia uma variedade de alterações comportamentais tanto em animais quanto em humanos (Hamdi e col., 1993). Já foi demonstrado que a PSP em ratos provoca aumento da atividade motora, da irritabilidade, da agressividade espontânea, da sensibilidade acústica, dos comportamentos sexual, de auto-*grooming*, de construção de ninhos, da fome, redução do limiar convulsivante, redução da defecação e enurese, do comportamento de *freezing* quando o animal é colocado em um ambiente novo,



alterações nos processos de aprendizado e memória, principalmente na aquisição da memória, alterações no metabolismo energético, além de alterações no balanço redox e alterações na percepção da dor (Cohen e Dement, 1965; Albert e col., 1970; Sloan, 1972; Tufik, 1981; Santos e Carlini, 1983; Bergmann e col., 1989; Everson e col., 1994; D'Almeida e col., 1997; Onen e col., 2001; Stickgold e Walter, 2007; Ferraz e col., 2007; Damasceno e col., 2008 e 2009; Skinner e col., 2011)

Estas alterações parecem ser decorrentes de mudanças primárias em vários sistemas de neurotransmissores centrais relacionadas ao número, sensibilidade e funcionalidade de receptores farmacológicos, e ao nível endógeno desses transmissores (Tufik, 1981; Santos e Carlini, 1983).

#### 1.4.1 Técnicas de privação de sono paradoxal

A maioria das técnicas utilizadas para a privação de sono paradoxal em ratos são modificações de uma técnica, desenvolvida por Jouvet e colaboradores em 1964 para gatos, conhecida como técnica do pote de flor invertido ou método de plataforma única (PU). Esse método foi adaptado para ratos por Cohen e Dement (1965).

A técnica consiste de plataformas estreitas (6,5 cm de diâmetro) cercadas de água onde são colocados os animais. A perda do tônus muscular associada com o início da fase paradoxal faz com que o animal caia na água e acorde rapidamente. Por não se tratar de uma técnica que requer complexa instrumentação, é um método largamente utilizado em estudos de PSP.

No entanto, já se sabe, que algumas variáveis como o estresse associado ao isolamento, a restrição de movimento, o ambiente úmido e fadiga muscular (Fishbein e Gutwein, 1977; Kovalzon e Tsibulsky, 1984; Coenen e Van Luijtellar, 1985; Suchecki e col., 1998) podem promover interferências nesses experimentos.

De maneira a reduzir a restrição de movimento associada com a técnica de PU, Van Hulzen e Coenen (1981) introduziram o procedimento de múltiplas plataformas onde um único rato é colocado em um tanque contendo sete plataformas, o que permite que o animal se movimente pelo tanque. Porém, índices significativos de estresse ainda foram observados com a utilização desse procedimento como atrofia do timo, perda de peso e hipertrofia da adrenal (Coenen e Van Luijtellar, 1985). A técnica foi posteriormente modificada com o objetivo de eliminar o isolamento social e passou-se a colocar os animais juntos em um único

tanque. Dez animais vindos de caixas diferentes eram colocados em um tanque contendo dezoito plataformas, com o objetivo de reduzir o isolamento social e a imobilidade (Nunes e Tufik, 1994).

Suchecki e colaboradores (1998) demonstraram que ratos submetidos a esse procedimento apresentaram aumento de ACTH e corticosterona plasmáticos semelhantes ou maiores ao observado nos animais submetidos à técnica de PU. Como os ratos são animais que estabelecem relações de hierarquia e dominância dentro do grupo, os autores interpretaram esse aumento na atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) como resultado da instabilidade social durante o período de privação de sono.

Em 2000, Suchecki e colaboradores adaptaram a técnica de múltiplas plataformas e mostraram que animais criados em grupos e privados de sono juntamente com seus pares apresentam índices de estresse atenuados em comparação aos animais que foram privados de sono como parte de um grupo socialmente instável. O método ficou conhecido como técnica de múltiplas plataformas modificada (MPM) e passou a ser largamente utilizado.

### **1.5 Sono e sistema imune**

Uma quantidade adequada de horas de sono é necessária para a manutenção da saúde e um bom funcionamento orgânico diário. O conceito de que a falta de sono pode comprometer a imunidade tem profundas implicações na saúde pública para os indivíduos e a sociedade.

Evidências de que a privação de sono tem efeitos negativos na resposta imune indicam que o sono pode ser considerado parte vital do sistema imune. Um sono inadequado ou a privação de sono, seja em consequência do estilo de vida, da idade, ou de condições de saúde desfavoráveis, são responsáveis por inúmeras alterações comportamentais e fisiológicas e um grande número de estudos têm mostrado uma associação entre privação de sono e resposta inflamatória (Meier-Ewert e col., 2004; Irwin e col., 2006; Irwin e col., 2008).

Indivíduos que apresentam distúrbios do sono, como insônia crônica ou aqueles que sofrem privação de sono, fazem parte de um grupo de risco para doenças crônicas (Dew e col., 2003) como as doenças cardiovasculares, artrite, diabetes, certos tipos de câncer e obesidade, além de hipertensão e disfunções do sistema nervoso autônomo, gerando conseqüentemente uma maior utilização dos

serviços médicos e hospitalares por parte dessa população. O declínio funcional característico dessas doenças está associado com a ativação de sinais celulares que induzem a expressão de citocinas inflamatórias (Volpato e col., 2001; Karin e Greten, 2005; Knutson e col., 2007), e por isso é cada vez mais importante considerar as consequências da perda de sono sobre os mecanismos inflamatórios.

Sono e sistema imune parecem ter uma relação de reciprocidade. Essa relação é corroborada por estudos que demonstram que a ativação do sistema imune altera o padrão de sono (Spath-Schwalbe e col., 1998; Takahashi e col., 1999) e que distúrbios do sono afetam a função imune (Everson, 1993; Born e col., 1997).

#### 1.5.1 O sistema imune influenciando o sono

O aumento da sonolência e da fadiga está entre as principais manifestações de desordens inflamatórias. Algumas evidências sugerem que as citocinas têm papel importante em “alertar” o cérebro do curso da inflamação em tecidos periféricos (Krueger e Majide, 2003). Trabalhos sobre a patogênese da resposta de fase aguda a infecção mostraram que as citocinas são as principais mediadoras da sonolência e da fadiga (Dinarello 1988; Moldofsky, 1994).

No cérebro as citocinas funcionam como importantes mediadores de complexas funções fisiológicas e comportamentais, incluindo o sono (Lorton e col., 2006). Um dos primeiros trabalhos relacionando sono e sistema imune envolveu os efeitos da interleucina (IL) -1 nos estágios do sono (Moldofsky e col., 1986). As citocinas que têm sido mais estudadas com relação ao sono são a IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF) - $\alpha$  (Opp e col., 1992; Dickstein e col., 1999; Shearer e col., 2001; Irwin e col., 2006, 2008). Tais citocinas têm papel importante na resposta inflamatória de fase aguda, e a administração de IL-1 e TNF- $\alpha$  em animais aumenta o tempo gasto com sono NREM. Utilizando fragmentos do receptor de TNF e IL-1, como inibidores dessas citocinas, Takahashi e colaboradores (1999) mostraram que a injeção intracerebroventricular desses fragmentos reduz significativamente o sono NREM em coelhos. Além disso, o bloqueio do efeito de qualquer uma dessas duas citocinas leva à inibição do sono espontâneo e do efeito rebote que normalmente é observado após períodos de privação de sono (Krueger e col., 2001).

Alguns trabalhos que relacionam processos infecciosos com o sono têm mostrado que ele está aumentado durante esse tipo de processo. Toth e

colaboradores conduziram vários experimentos utilizando diferentes tipos de patógenos (influenza, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Candida albicans* e *T. brucei*) e todos resultaram em alterações no padrão de sono, em geral, apresentando um aumento na duração do sono de ondas lentas (Toth e Krueger, 1988; Toth e col., 1992; Toth e col., 1995; Toth, 1995;).

O aumento da quantidade de sono não está relacionado apenas a infecções por microorganismos, mas também pode ser mediado por seus componentes, como no caso do LPS (lipopolissacarídeo) e os peptídeos muramil. A administração intraperitoneal, oral ou intracerebroventricular de peptídeos muramil em coelhos é sonogênica, isto é, capaz de induzir o sono, com aumento dose dependente na duração do sono de ondas lentas e redução do sono paradoxal (Shoham e col., 1987). A administração intraperitoneal de LPS em ratos leva a febre e uma redução inicial do sono paradoxal seguido de um aumento de sono NREM (Lancel e col., 1995; Schiffelholz e Lancel, 2001).

#### 1.5.2 O sono influenciando o sistema imune

Por outro lado, diversos trabalhos, em humanos e animais, têm mostrado que a privação de sono parece alterar funções do sistema imune. É descrito na literatura que o número de células brancas circulantes, particularmente granulócitos e monócitos, está elevado durante a privação de sono (Dinges e col., 1994; Born e col., 1997). Um estudo clínico mostrou ainda que 64 horas de privação de sono total levam a um aumento na atividade de células *natural killers* (NK), neutrófilos e monócitos, fonte primária de citocinas inflamatórias (Dinges e col., 1994). Mesmo após uma noite de recuperação os níveis desses leucócitos mantiveram-se aumentados. Similarmente, uma única noite de privação de sono total aumentou os níveis de monócitos, células NK e linfócitos (Born e col., 1997). Os níveis de receptores solúveis para IL-6 e TNF- $\alpha$  também estão alterados após longos períodos de vigília (Shearer e col., 2001).

A privação de sono de uma única noite ou de até três noites (Spath-Schwalbe e col., 1998; Takahashi e col., 1999; Redwine e col., 2000; Marshall e Born 2002), assim como a redução do sono em 20% a 25% em dias consecutivos (Meier-Ewert e col., 2004; Vgontzas e col., 2004) induzem um aumento nos níveis de IL-6 e proteína C-reativa. Além disso, já foi visto que pacientes que sofrem de insônia primária apresentam aumento dos níveis de IL-6 (Vgontzas e col., 2002; Burgos e col., 2006).

Fica evidente que distúrbios do sono podem resultar em alterações na função imune, no entanto o exato mecanismo através do qual isso ocorre ainda precisa ser compreendido.

Os dados da literatura evidenciam cada vez mais que a privação de sono tem um impacto considerável na resposta imune e essa relação parece ser de reciprocidade, indicando que o sono pode ser considerado parte vital do sistema imune. A compreensão mais profunda de possíveis vias celulares e moleculares que interligam sono e sistema imune levaria a uma melhor compreensão dos benefícios do sono, possíveis intervenções e terapias. Desta maneira, a observação dos efeitos da privação de sono sobre a resposta inflamatória contribuiria de maneira importante para a compreensão do papel do sono na regulação do sistema imune

## 2 INFLAMAÇÃO

A resposta inflamatória é um processo desenvolvido pelo organismo que envolve uma série de eventos vasculares e celulares, desencadeados por diversos estímulos de origem química, física ou biológica.

Na fase aguda, essa resposta é caracterizada por uma vasodilatação local, aumento do fluxo sanguíneo na área inflamada e aumento da permeabilidade microvascular, causando extravasamento de líquido e proteínas plasmáticas para os tecidos, o que leva à formação de edema. O aumento da permeabilidade promove o aumento da viscosidade sanguínea, caracterizando a estase. Como consequência da estase os leucócitos saem do centro dos vasos sanguíneos e passam a se orientar periféricamente margeando o endotélio vascular (Williams, 1989; Ali e col., 1997).

Concomitante a esses eventos ocorre um aumento na expressão de moléculas de adesão celular e na liberação de mediadores quimiotáticos que vão favorecer a movimentação das células inflamatórias da circulação periférica em direção ao local da injúria. Citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 ativam vias de sinalização específicas em células endoteliais que vão regular a expressão dessas moléculas de adesão para iniciar a transmigração de leucócitos circulantes (Shanley, Warner, Ward, 1995) (Fig.3).

O recrutamento de leucócitos da circulação tem início com o tráfego de polimorfonucleares granulócitos seguidos por monócitos. Esta resposta pode envolver também mastócitos e macrófagos teciduais residentes, cuja degranulação e ativação liberam mediadores inflamatórios incluindo aminas bioativas (histamina e serotonina), citocinas, quimiocinas, e também mediadores lipídicos que recrutam e ativam células inflamatórias, levando aos sinais clássicos da inflamação: calor, rubor, dor, edema e perda da função tecidual (Shanley, Warner, Ward, 1995).

Esses eventos resultam em um predomínio de neutrófilos na área inflamada no início da lesão, que são depois gradualmente substituídos por células mononucleares, principalmente monócitos que, em seguida, diferenciam-se em macrófagos no tecido. Estas células fagocitam material estranho e detritos celulares liberam enzimas hidrolíticas e proteolíticas e geram espécies reativas de oxigênio que eliminam e digerem organismos invasores (Lawrence e col., 2005).

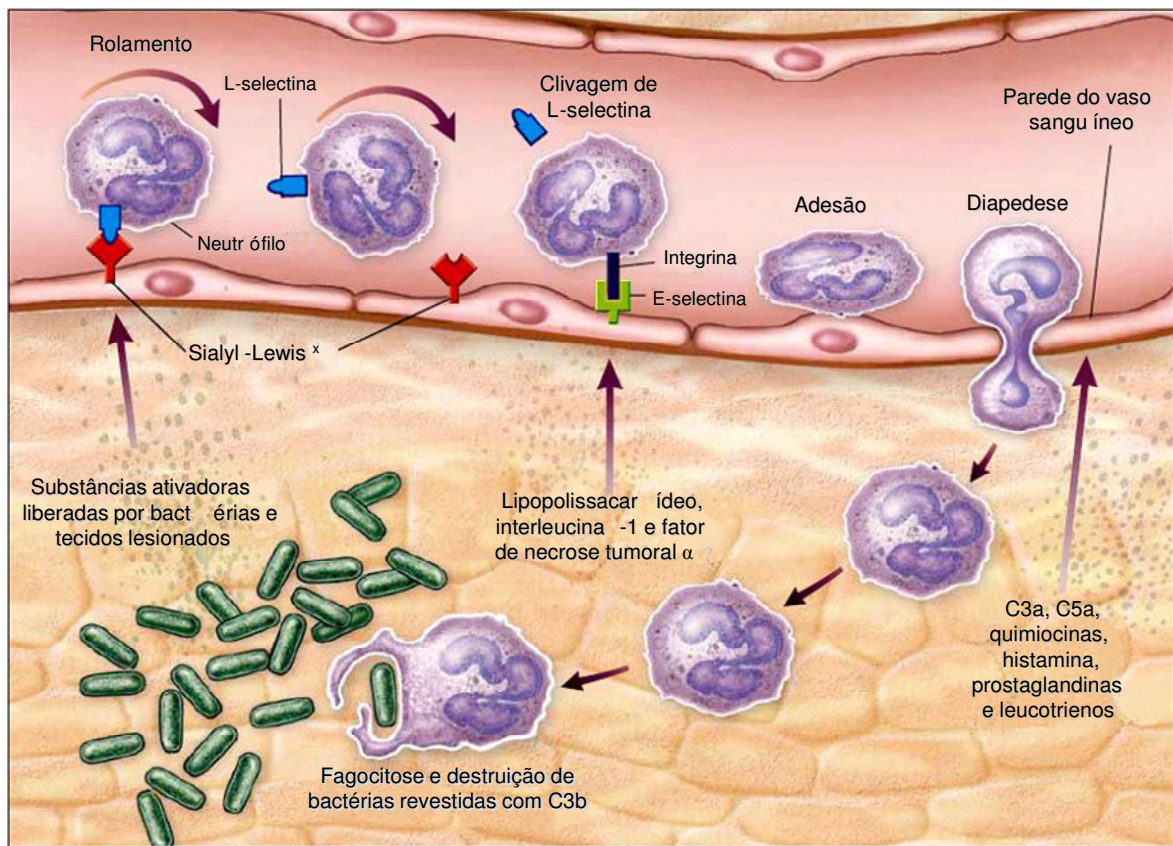


Figura 3: Processo de migração de neutrófilos e eliminação de agentes infecciosos. O esquema representa as fases do processo de migração celular e os mediadores envolvidos. (Adaptado de Delves e Roitt, 2000). À medida que os neutrófilos rolam ao longo da parede do vaso sanguíneo, a L-selectina na sua superfície liga-se a carboidratos, estruturas de Sialyl-Lewis<sup>x</sup>, sobre o endotélio vascular. À medida que os neutrófilos tornam-se ativados, a L-selectina em sua superfície é substituída por outras moléculas de adesão como as integrinas. Essas integrinas se ligam a E-selectina presente na superfície de células endoteliais. O neutrófilo ativado alcança o tecido lesionado, onde é atraído para o local da infecção por quimioatratantes, e pode então, fagocitar e eliminar os microorganismos.

A inflamação aguda tem vários desfechos, que incluem a progressão para inflamação crônica, formação de cicatrizes e fibroses ou a resolução completa (Cotran, Kumar, Collins, 1999).

Uma resposta inflamatória aguda bem sucedida resulta na eliminação do agente injuriante seguida pela fase de resolução e reparo, que é mediada principalmente por macrófagos residentes e recrutados. A mudança no perfil dos mediadores lipídicos de prostaglandinas pró-inflamatórias para lipoxinas (LXs) é

crucial para a transição da inflamação para o processo de resolução (Medzhitov, 2008; Serhan, 2005).

A resolução da resposta inflamatória é um processo ativo que envolve circuitos bioquímicos com síntese de mediadores locais como as LXs e resolvinas (Serhan 1997, Serhan e Savill, 2005, Serhan, 2007). Dentre as ações desses mediadores durante o processo de resolução, destacam-se a inibição do tráfego de neutrófilos, da adesão a células endoteliais e da transmigração, além da facilitação da remoção de células apoptóticas (Lee e col., 1989; Papayanni e col., 1996).

As LXs são mediadores lipídicos gerados a partir do ácido araquidônico (AA) que apresentam propriedades anti-inflamatórias e estão envolvidos no processo de resolução da inflamação. Inibem o recrutamento de neutrófilos e promovem o recrutamento de monócitos que removem restos celulares e iniciam o remodelamento do tecido (Serhan, 2005).

As resolvinas constituem outra classe de mediadores lipídicos que têm papel importante na resolução da inflamação, incluindo a iniciação do reparo tecidual (Serhan, 2005 e 2007).

No entanto, se durante o processo inflamatório agudo o patógeno não for neutralizado adequadamente, a resposta inflamatória pode persistir, podendo evoluir para um quadro de inflamação crônica. Além da persistência de patógenos, a inflamação crônica pode resultar de outros danos ao tecido como, por exemplo, as respostas autoimunes geradas devido à persistência de antígenos próprios (Kumar e Cotran, 2003; Majno e Joris, 2004).

Esse tipo de estado envolve a destruição dos tecidos periféricos por mediadores inflamatórios potencialmente citotóxicos e geração de *debris* celulares, o que acarreta proliferação de fibroblastos e tecido conjuntivo. São também característicos do processo inflamatório crônico o recrutamento de leucócitos mononucleares, angiogênese, e o depósito de tecido fibroso por fibroblastos, levando à formação de granuloma. Esse quadro patológico se retro-alimenta e pode persistir por meses e até anos (Serhan e Savill, 2005).



### 3 SEPSE

A desregulação da resposta inflamatória é a base para uma série de doenças, entre elas a sepse, que se caracteriza por uma resposta inflamatória sistêmica intensa e descontrolada frente a uma infecção, evoluindo nos casos desfavoráveis para o choque séptico, culminando com a disfunção de múltiplos órgãos (Wenzel, 2002; Rangel-Fausto e col., 1995; Medzhitov, 2008).

As definições atualmente empregadas consideram que a sepse, sepse severa e o choque séptico representam estágios evolutivos da mesma doença, o que não significa necessariamente um aumento da gravidade do processo infeccioso e sim da gravidade da resposta sistêmica (Rangel-Fausto e col., 1995).

Em uma conferência organizada pela *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine*, em 1991, estabeleceu-se a definição clínica para a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, *systemic inflammatory response syndrome*) como o conjunto de manifestações clínicas em resposta à agressão orgânica grave que ocorre necessariamente na ausência de infecção. A SIRS é caracterizada pela presença de dois ou mais dos seguintes sintomas: temperatura maior que 38 °C ou menor que 36 °C; frequência cardíaca maior que 90 bpm; frequência respiratória maior que 20 movimentos/minuto; leucometria maior que 12.000/mm<sup>3</sup> ou menor que 4.000/mm<sup>3</sup>, ou, ainda, presença maior do que 10% de bastões.

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica com a presença dos sinais e sintomas descritos acima, porém a infecção é documentada, já que a SIRS pode ser causada por diversas outras injúrias consideradas como “estéreis”, tais como trauma, queimaduras, choque hemorrágico e pancreatite aguda (Beishuizen, Vermes, Haanen, 1999; Vincent, Abraham, 2006). Essa resposta exacerbada resultante da infecção caracteriza-se por uma produção sistêmica de mediadores inflamatórios e o estabelecimento de um estado de falência em diversos sistemas fisiológicos (Russel, 2006). O paciente pode desenvolver falência respiratória ou renal, anormalidades na coagulação e uma hipotensão profunda não responsiva a drogas vasopressoras (Cohen, 2002).

Após a interação inicial entre o agente microbiano e o hospedeiro, ocorre a ativação generalizada da resposta imune inata, cuja finalidade é coordenar uma resposta defensiva, envolvendo ambos os componentes humoral e celular. Células mononucleares desempenham um papel fundamental, liberando citocinas pró-

inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , e uma série de outras citocinas e moléculas, incluindo IL-12, IL-15 e IL-18, a proteína do grupo de alta mobilidade (HMG) B1 e o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) (Cohen, 2002).

Aliado a isso ocorre ativação de várias cascatas de proteínas plasmáticas como o complemento, a coagulação, e o sistema fibrinolítico. Mediadores lipídicos como eicosanóides e fator de ativação plaquetária, bem como radicais de oxigênio e nitrogênio são produzidos e liberados (Zanetti e col., 1992; Beishuizen e col., 1999).

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 são citocinas inflamatórias que medeiam muitas características imunopatológicas do choque induzido por LPS (Dinarello, 1997). Estas citocinas são liberadas durante os primeiros 30-90 minutos após a exposição ao LPS e, por sua vez, ativam um segundo nível de cascatas inflamatórias, incluindo citocinas, mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio, bem como aumentam a expressão de moléculas de adesão celular resultando na indução da migração de células inflamatórias para os tecidos (Cohen, 2002).

A excessiva produção de mediadores promovendo um estado hiper-inflamatório pode conduzir o paciente a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, choque, falência múltipla de órgãos e morte (Koch, 1998; Netea e col., 2003).

#### 4 DOR

A dor é um dos sinais clássicos da inflamação e decorre da sensibilização dos nociceptores (receptores responsáveis em detectar um estímulo doloroso). Tem um papel importante na defesa do organismo contra uma eventual lesão tecidual (Lee e Spanswick, 2006). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*) a dor pode ser definida como sendo uma experiência sensorial e emocional complexa associada a injúrias reais ou em potencial. A dor tem uma conotação subjetiva e sofre a influência de experiências anteriores (Merskey, 1994).

A percepção da dor é um evento complexo e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos (Julius e Basbaum, 2001). Neste sentido, nocicepção refere-se apenas à parte fisiológica da dor, sem levar em consideração os aspectos psicológicos. Enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo. Neste sentido, em animais, a dor é avaliada indiretamente através da observação comportamental de modelos animais de nocicepção (Tjølsen e Hole, 1997).

Em termos de duração, uma sensação dolorosa pode ser transitória, aguda ou crônica. Na dor transitória, a ativação dos nociceptores acontece na ausência de qualquer dano tecidual, e, neste caso, desempenha função protetora do organismo contra possíveis danos teciduais. Em contrapartida, a dor aguda é uma resposta normal causada por uma lesão de tecido com conseqüente ativação dos nociceptores no local da lesão, e desaparece até mesmo antes do restabelecimento do tecido lesado. Este tipo de dor geralmente aparece após cirurgias ou situações traumáticas e persiste menos que um mês, possuindo também caráter protetor. A dor crônica é causada por uma lesão tecidual ou doença que geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, ou seja, este tipo de dor não desaparece mesmo quando o trauma inicial (lesão) foi resolvido, podendo durar meses ou anos, sendo um importante fator de incapacidade e sofrimento (Loeser e Melzack, 1999; Lotsch e Geisslinger, 2001).

Tanto a dor aguda quanto a dor crônica estão frequentemente associadas a processos inflamatórios, como resultado da lesão tecidual, reatividade imune anormal ou lesão nervosa (Stein e col., 2003).

Quando ocorre um significativo dano tecidual, a dor é geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação. Nestas circunstâncias, pode ocorrer um quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores químicos produzidos pela lesão tecidual e pelo processo inflamatório decorrente (Dray, 1997). Dentre as desordens que comumente ocorrem em pacientes que apresentam dor com quadros de hipersensibilidade, pode-se citar a hiperalgesia (resposta exacerbada a um estímulo doloroso) e a alodinia (dor resultante de um estímulo que é normalmente não nocivo) (Millan, 1999).

A percepção do estímulo nociceptivo na periferia se dá por estruturas específicas localizadas na porção distal dos neurônios aferentes sensoriais, denominadas nociceptores, os quais são amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. O tecido que recebe a maior parte dos estímulos nociceptivos é a pele; é ela que fornece a maioria das informações nociceptivas (dolorosas, que são resultantes de lesões ou que poderiam causar lesões) periféricas ao sistema nervoso central (SNC) (Julius e Basbaum, 2001).

A sensibilização dos nociceptores deve-se a diferentes estímulos, tais como mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico). Existem ainda os chamados nociceptores silenciosos (*silent*), que são uma pequena proporção das fibras aferentes, os quais normalmente não são responsivos a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (Julius e Basbaum, 2001).

A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada através das fibras aferentes primárias (neurônios de primeira ordem) ao SNC. Essas fibras são classificadas, de acordo com seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução, essencialmente em três tipos: fibras C: finas (0,4 a 1,2 mm de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2,0 m/s); fibras A $\delta$ : médias (2 a 6 mm de diâmetro), mielinizadas e de condução intermediária (12 a 30 m/s) e 3) e fibras A $\beta$ : espessas (mais de 10 mm de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30 a 100 m/s) (Millan, 1999). Na pele, a proporção entre esses três tipos de fibras é de 70, 10 e 20% respectivamente, mas esses valores podem variar de acordo com a espécie e região do corpo analisada (Millan, 1999).

A sensibilização dos nociceptores pode ocorrer em decorrência de estímulos térmicos, mecânicos e/ou químicos, o que ocasiona a liberação local de diversos mediadores químicos, que medeiam ou facilitam a transmissão da informação ao SNC (Mense, 1983; Willis e Westlund, 1997; Millan, 1999).

Diversos mediadores têm sido propostos na gênese e na transmissão da dor, destacando-se os metabólitos derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), peptídeos como a bradicinina, taquicininas, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, substância P, colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo, serotonina, citocinas, óxido nítrico (NO), ATP, ADP, prótons, entre outros. Outros mediadores químicos, tais como os aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato), acetilcolina, e outros, que podem ser produzidos ou liberados após lesão tecidual ou ainda por irritantes exógenos (formalina, capsaicina, ácido acético), são também responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto central (Pleuvry e Lauretti, 1996; Millan, 1999; Petersen-Zeitz e Basbaum, 1999; Calixto e col., 2000; Woolf e Salter, 2000; Julius e Basbaum, 2001; Parada e col., 2003).

Uma vez sensibilizados, os nociceptores disparam potenciais de ação que são propagados, através das fibras nervosas aferentes C, A $\delta$  e A $\beta$ , para o corno dorsal medular. Na medula, as fibras aferentes fazem sinapses principalmente com neurônios das lâminas I, II e V (Basbaum e Fields, 1984).

A partir da medula, o estímulo doloroso prossegue via trato espinotalâmico para estruturas como o tálamo e, posteriormente, córtex cerebral (região parietal posterior), quando ocorre então a percepção da dor. Os estímulos nociceptivos também se dirigem para o sistema límbico (amígdala), que determina o aspecto afetivo da dor (Kummer e Coelho, 2002).

Sendo assim, uma vez que o nociceptor é sensibilizado por mediadores químicos, potenciais de ação são disparados e conduzidos pelos axônios à medula espinhal e posteriormente ao córtex cerebral, onde a sensação nociceptiva será detectada e analisada (percepção do estímulo).

Diversos estudos descritos na literatura, tanto em humanos quanto em animais, mostram uma correlação entre distúrbios do sono e dor. Uma das principais queixas entre pacientes que sofrem de dor crônica é a insônia e a sonolência durante o dia, ao mesmo tempo, indivíduos saudáveis submetidos à privação de

sono por uma ou três noites apresentam alterações na sensibilidade à dor (Kundermann e col., 2004). Em animais também é possível observar essa reciprocidade - a PSP leva a um aumento na sensibilidade à dor induzida por estimulação térmica, química, mecânica ou elétrica (Hicks e col., 1978; Onen e col., 2001; Nascimento e col., 2007). Por outro lado, animais submetidos à ligação do nervo ciático mostraram alterações na arquitetura do sono (Enomoto e col., 2011).

O estabelecimento de uma nova abordagem farmacológica, capaz de interromper esta dupla relação causa e efeito, apresentaria um elevado valor para o melhor entendimento dos processos biológicos envolvidos neste processo.

## 5 LIPOXINAS

As LXs são mediadores derivados do AA que estão envolvidos no processo de resolução da inflamação. A LXA<sub>4</sub> e a LXB<sub>4</sub> são isômeros posicionais gerados a partir da ação de duas ou mais lipoxigenases (LO) sobre o AA. São produzidas durante interações celulares por três diferentes vias de biossíntese. A primeira envolve a ação da 15-LO, presente em células epiteliais e monócitos, o produto intermediário dessa reação serve como substrato para a ação da 5-LO, presente em neutrófilos, formando LXA<sub>4</sub> e LXB<sub>4</sub> (Serhan, 1997).

A segunda via envolve a interação entre plaquetas e neutrófilos. O leucotrieno A<sub>4</sub>, produto da 5-LO de neutrófilos, é captado pelas plaquetas e convertido em LXA<sub>4</sub> e LXB<sub>4</sub> por ação da 12-LO (Romano e Serhan, 1992).

Na terceira via a aspirina acetila a enzima ciclooxigenase (COX) -2 inibindo a biossíntese de prostanóides e desviando essa reação para a formação de um intermediário que, sob a ação da 5-LO presente em neutrófilos, origina os epímeros de lipoxina ou *aspirin triggered lipoxins* (ATL) (Clària e Serhan, 1995). É possível que a ação analgésica da aspirina envolva não apenas a inibição da produção de prostaglandinas, mas também a formação de ATL.

Os ATL apresentam as mesmas atividades anti-inflamatórias das LXs, porém são mais resistentes à inativação metabólica (Serhan, 2005). Análogos mais estáveis e potentes, com uma menor suscetibilidade à inativação enzimática, foram desenvolvidos (Parkinson, 2006) e vem sendo largamente utilizados em diversos ensaios biológicos.

LX, ATL e seus análogos ligam-se com alta afinidade a um receptor acoplado à proteína G conhecido como ALX (Fiore e col., 1992 e 1994; Takano e col., 1997; Chiang e col., 2000). A ligação da LXA<sub>4</sub> ao seu receptor inibe a quimiotaxia, aderência e transmigração de neutrófilos (Lee e col., 1989; Serhan e col., 1995), além da produção de ânion superóxido por essas células (Levy e col., 1999); facilita a resolução da inflamação estimulando a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos sem que ocorra a liberação de citocinas e/ou quimiocinas (Maddox e col., 1997), e também atenua ativação do fator nuclear (NF) κB e inibe a fosforilação de ERK (kinase regulada por sinal extracelular) (Serhan, 2005).

Muitos dos fatores atenuados pela ligação das LXs ao seu receptor estão envolvidos no processamento da dor tanto no local da lesão quanto na medula

espinhal. Svensson e colaboradores (2007) demonstraram que a LXA<sub>4</sub> é capaz de inibir o processo de dor induzido por lesão tecidual, possivelmente através da modulação de astrócitos no corno dorsal medular, atenuando vários fatores relacionados à resposta inflamatória, incluindo aqueles envolvidos no processamento da dor. O mecanismo de regulação endógena da dor pela LXA<sub>4</sub> sinaliza para uma nova possibilidade terapêutica de controle da dor, através do uso de substâncias agonistas dos receptores das LXs.

Além de alterações no perfil imunológico, a PSP provoca um quadro de hipernocicepção, e essa condição hiperalgésica não é revertida com os analgésicos clássicos. Considerando ainda que as LXs apresentam um papel modulador de fatores envolvidos no processamento da dor, seria interessante investigar um possível efeito analgésico das LXs na condição hiperalgésica induzida pela PSP.



## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a resposta inflamatória em ratos PSP, e investigar se um análogo sintético de 15-epi-lipoxinas (ATL-1) é capaz de reverter a hiperalgesia induzida pela PSP.

### 6.2 Objetivos específicos

- 1- Caracterizar a resposta inflamatória induzida pela carragenina, através da avaliação do recrutamento de leucócitos e dosagem de citocinas pró-inflamatórias, no modelo da bolha de ar (*air pouch*) e na pleurisia, após 96h de PSP;
- 2- Analisar a sobrevivência de animais submetidos a um modelo de sepse (CLP) antes e após a PSP;
- 3- Caracterizar a resposta inflamatória no modelo de CLP através da avaliação do recrutamento de leucócitos e dosagem de citocinas pró-inflamatórias, antes e após a PSP;
- 4- Investigar o efeito da administração intravenosa de ATL-1 na hiperalgesia induzida pela PSP, através do modelo da formalina.

## **7 METODOLOGIA**

### **7.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos (250 g - 320 g) com idade entre 2 a 3 meses fornecidos pelo biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ( $23 \pm 1$  °C) e ciclo claro/escuro (fase clara das 6 as 18 horas) controlados, água e ração permanentemente disponíveis durante todo o período experimental.

Todos os procedimentos experimentais realizados nesta tese foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/032/2010).

### **7.2 Modelos experimentais**

#### **7.2.1 Privação de Sono Paradoxal (PSP)**

No presente trabalho utilizaram-se a técnica de múltiplas plataformas modificada (MPM) e a técnica de plataforma única (PU) como ferramentas para induzir a privação de sono paradoxal.

##### **7.2.1.1 Técnica de múltiplas plataformas modificada (MPM)**

Os animais, crescidos em uma mesma caixa, foram colocados em um tanque de alumínio (120 cm x 40 cm x 40 cm) sobre plataformas estreitas de 6,5 cm de diâmetro cada, cercadas por água até 1 cm da sua superfície (Fig. 4) . A entrada do animal na fase paradoxal é acompanhada da perda do tônus muscular, o que faz com que o animal caia na água, acordando durante essa fase de sono. Dados da literatura demonstraram que a utilização desse modelo produz 100% de privação da fase paradoxal (Machado e col., 2004). Os animais foram mantidos nessas condições por 96 horas.

Os animais do grupo controle foram mantidos em caixas de propileno na mesma sala onde os animais PSP eram mantidos.

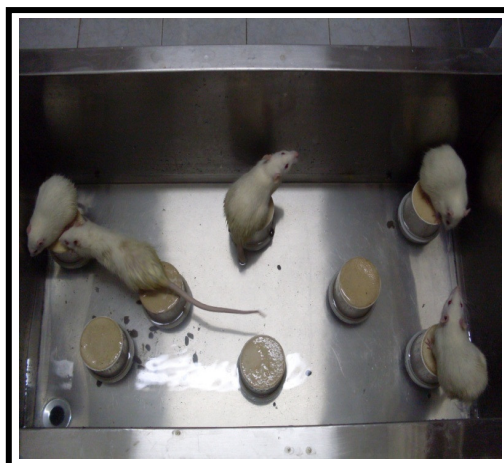


Figura 4: Figura ilustrando o tanque utilizado na técnica de MPM para a privação de sono paradoxal.

#### 7.2.1.2 Técnica da plataforma única (PU)

Esta técnica se baseia no mesmo princípio da técnica de MPM, porém os animais são privados individualmente. Cada animal é mantido sobre uma plataforma estreita de 6,5 cm de diâmetro no interior de uma lata contendo água até 1 cm do topo da plataforma (Cohen e Dement, 1965), durante 96 horas, constituindo assim o grupo PSP (Fig. 5). Durante a vigília e a fase de sono NREM, o animal é capaz de equilibrar-se na plataforma estreita, contudo, ao entrar na fase de sono paradoxal, em função da perda do tônus muscular, o animal toca a água e acorda rapidamente.



Figura 5: Figura ilustrando o aparato utilizado na técnica de PU para a privação de sono paradoxal.

### 7.2.2 Modelo da bolha de ar (air-pouch)

O modelo consiste da formação de uma cavidade artificial no dorso do animal a partir da injeção subcutânea de ar estéril (Fig. 6). Inicialmente foram injetados 20 ml de ar no dorso do animal. Após 72 h uma nova injeção de ar (10 ml) foi feita para a manutenção da cavidade. Seis dias após a primeira injeção de ar foi feita a administração do agente flogístico. No presente estudo utilizou-se 500 µg por cavidade de carragenina diluída em 1 ml de PBS estéril. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de PBS estéril.



Figura 6: Figura ilustrativa do procedimento de obtenção da cavidade no modelo da bolha de ar. A cavidade artificial é obtida através da injeção de 20 ml de ar estéril subcutâneo.

### 7.2.3 Pleurisia

A pleurisia foi induzida através da injeção intratorácica de 100 µl de carragenina (500 µg/cavidade) (Fig. 7). A injeção foi realizada do lado direito da caixa torácica com agulhas 13 x 0,45 mm (26 G<sup>1/2</sup>) adaptadas, medindo aproximadamente 3 mm de comprimento. Os animais utilizados como controle receberam igual volume de PBS estéril.

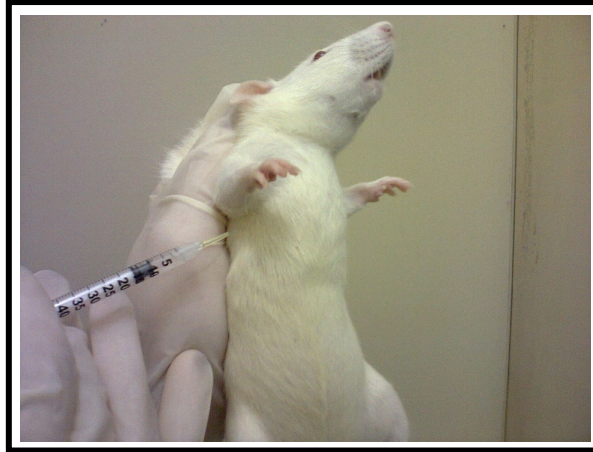


Figura 7: Figura ilustrativa do momento da injeção intratorácica de carragenina.

#### 7.2.4 Indução da sepse por ligadura e perfuração do ceco

A indução da sepse foi realizada utilizando-se o CLP (*Cecal Ligation and Puncture*). Os ratos foram anestesiados com uma solução anestésica de quetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal.

Após a tricotomia e assepsia da região abdominal, realizada com álcool iodado, os animais foram submetidos a uma laparotomia com incisão longitudinal de aproximadamente 2 cm (Fig.8A), por onde o ceco foi exposto (Fig. 8B). Próximo a região ileocecal o ceco foi parcialmente ocluído com fio de sutura (Fig.8C) e recebeu 10 perfurações utilizando-se uma agulha estéril 16 G. Logo após a perfuração, o ceco foi levemente comprimido para extravasamento do conteúdo fecal. O ceco foi recolocado na cavidade peritoneal e tanto a musculatura quanto a pele foram suturadas e a região abdominal foi limpa utilizando-se álcool iodado (Fig. 8D). Após o procedimento os animais receberam uma injeção subcutânea de 5 ml de solução fisiológica para reposição hídrica (Torres-Dueñas e col., 2006).

Os animais utilizados como controles cirúrgicos foram submetidos aos mesmos procedimentos, apenas não sofrendo as perfurações no ceco. Nenhum dos ratos falso-operados (grupo *Sham*) morreu durante o período de avaliação.

Várias sequências de cirurgia foram realizadas até se conseguir reprodutibilidade da taxa de sobrevivência. A construção das curvas de sobrevida foi feita a partir da observação dos ratos em intervalos de 24 h durante quatro dias.

Neste trabalho, a sepse induzida por 10 perfurações cecais foi o procedimento de escolha, pois houve uma menor perda de ratos, o que permitiu

acompanhar a evolução de possíveis alterações por um período de tempo mais longo (quatro dias).

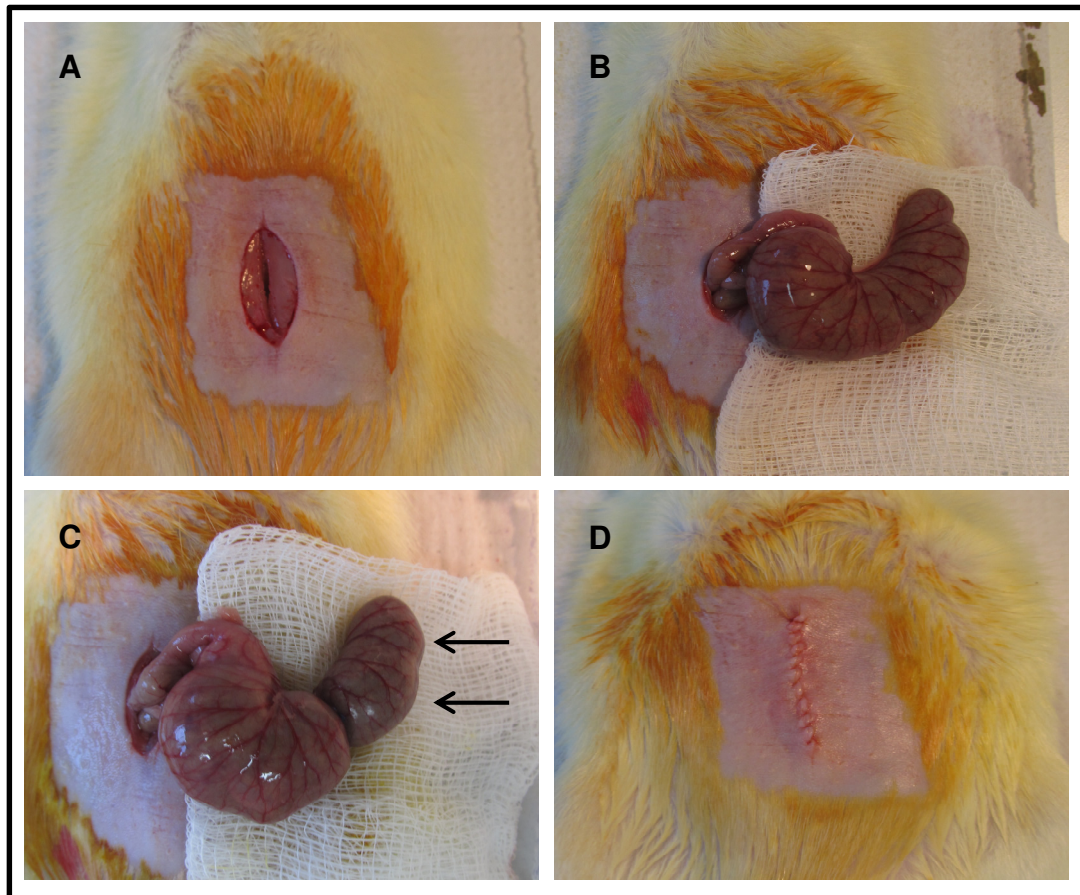


Figura 8: Fotografias ilustrando o procedimento do CLP. Incisão abdominal (A), exposição do ceco (B), oclusão parcial do ceco, as setas indicam o local das perfurações (C), sutura abdominal (D).

### 7.3 Obtenção do sangue e do lavado

#### 7.3.1 Bolha de ar (air pouch)

Quatro horas após a administração de carragenina, os animais foram profundamente anestesiados e o sangue foi retirado através de punção cardíaca, com o auxílio de seringas e agulhas previamente heparinizadas. Após a coleta, o sangue foi centrifugado em tubos de ensaio a 3.000 rpm por 15 minutos e o plasma foi coletado, aliquotado e estocado em freezer – 80 °C para posterior dosagem de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

As bolsas de ar foram lavadas com 10 ml de PBS estéril heparinizado. O lavado foi armazenado em tubos e posteriormente diluído para contagem total e diferencial das células. Uma pequena quantidade do lavado foi centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi aliqotado e armazenado em freezer – 80 °C.

### 7.3.2 Pleurisia

Duas, quatro, e vinte e quatro horas após a injeção de carragenina os animais foram profundamente anestesiados e o sangue foi obtido por punção através da aorta abdominal utilizando-se seringas e agulhas previamente heparinizadas. Após a coleta, o sangue foi centrifugado em tubos de ensaio a 3.000 rpm por 15 minutos e o plasma foi coletado, aliqotado e estocado em freezer – 80 °C.

A cavidade pleural foi lavada utilizando-se 3 ml de PBS estéril heparinizado. O lavado obtido foi armazenado em tubos apropriados e posteriormente diluído para contagem total e diferencial das células. Uma pequena quantidade do lavado foi centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi aliqotado e armazenado em freezer – 80 °C.

### 7.3.3 CLP

Os animais foram profundamente anestesiados e o sangue foi obtido por punção cardíaca com o auxílio de seringas e agulhas previamente heparinizadas e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, aliqotado e armazenado em freezer – 80 °C.

A cavidade abdominal foi lavada com 20 ml de PBS estéril heparinizado, o lavado foi aliqotado e posteriormente diluídos para contagem total e diferencial das células presentes.

## 7.4 **Quantificação das células do sangue e do lavado**

### 7.4.1 Contagem celular total

Para a contagem total de leucócitos foram utilizadas alíquotas de lavado e sangue em solução de Turk (ácido acético 2%) em uma proporção de 1:40. A contagem foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer e um microscópio

óptico comum (aumento de 200x). Os valores obtidos foram expressos em número total de leucócitos por mililitro e número total de leucócitos por cavidade.

#### 7.4.2 Contagem celular diferencial

A contagem diferencial das células do lavado foi feita em esfregaços preparados em citocentrífuga (Incibrás), corados pelo método de *May Grunwald-Giemsa* e avaliada em microscópio óptico utilizando-se objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000x). A mesma coloração foi realizada em esfregaços sanguíneos. Foi feita a análise morfológica dos tipos de leucócitos contando-se 100 células em cada lâmina. Os valores foram expressos em porcentagem de células mononucleares, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos.

#### 7.5 **Dosagem de citocinas**

As dosagens de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no plasma foram realizadas por ELISA utilizando-se um kit comercialmente disponível (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). A dosagem foi feita conforme instruções do fabricante. O mesmo protocolo foi seguido para a dosagem das três citocinas, porém as concentrações de anticorpos e os valores da curva padrão foram diferentes para cada uma.

Uma placa de 96 poços foi coberta com anticorpo de captura na concentração de 1  $\mu$ g/ml (IL-6), 2  $\mu$ g/ml (IL-1 $\beta$ ) ou 1  $\mu$ g/ml (TNF- $\alpha$ ) e incubada *overnight* em temperatura ambiente. Após este período a placa foi lavada quatro vezes (Tween - 20 0,05% em PBS) e em seguida bloqueada (BSA 1% em PBS) por duas horas. Após algumas lavagens, a curva padrão (de 0,0 pg/ml a 8000 pg/ml para IL-6, ou de 0,0 pg/ml a 3000 pg/ml para IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ ) e as amostras foram incubadas por duas horas em um volume de 100  $\mu$ l / poço. Em seguida, a placa foi lavada novamente e incubada com anticorpo de detecção na concentração de 0,25  $\mu$ g/ml (IL-6) ou 0,5  $\mu$ g/ml (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) por duas horas. Após novas lavagens, adicionou-se à placa 100  $\mu$ l de avidina-HRP diluída 1:2.000 em solução diluente (Tween-20 0,05%, BSA 0,1% em PBS). Após 30 minutos o substrato 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico – ABTS) (Sigma, St Louis, MO) foi adicionado e a placa foi mantida protegida da luz. A leitura da placa foi realizada a cada 5 minutos em leitor de placas no comprimento de onda de 405 nm com correção a 650 nm. Todas as dosagens foram feitas em triplicatas.



## 7.6 Análise comportamental

### 7.6.1 Administração do ATL-1

O 15-epi-16-(*para*-flúor)-fenoxi-lipoxina A<sub>4</sub> (ATL-1), o análogo estável de 15-epi-lipoxina A<sub>4</sub>, foi gentilmente doado pelo *Brigham and Women's Hospital (Harvard Medical School, Boston, MA)*.

Para a utilização nos experimentos, o ATL-1 foi dissolvido em solução salina (0,9%) estéril e administrado por via intravenosa, através da veia peniana, na dose de 10 µg/kg. A administração era feita 2 minutos antes da injeção intraplantar de formalina 2,5 %.

### 7.6.2 Teste da formalina

Utilizou-se o teste da formalina como um modelo de teste nociceptivo químico. Os animais (n=6/grupo) tinham suas patas traseiras direitas injetadas subcutaneamente com 50 µl de solução de formalina 2,5%, utilizando-se uma seringa de 1 ml com agulha 30 G (0,30 mm de calibre). Após a injeção, os animais eram colocados individualmente em um cilindro de acrílico transparente, que permitia a gravação dos comportamentos relacionados à dor (lambida/mordida/tremor) na pata injetada (Fig. 9). Após o período de observação (45 minutos), os animais eram removidos para câmaras de monóxido de carbono e eutanizados.



Figura 9: Fotografia ilustrando o aparato utilizado para observação comportamental durante o teste da formalina.

## 7.7 Desenho experimental

### 7.7.1 Bolha de ar (*air pouch*)

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: Controle (CTRL), Controle Carragenina (CTRLcg), Privado de Sono Paradoxal (PSP) e Privado de Sono Paradoxal Carragenina (PSPcg). Após 48 horas da primeira injeção de ar estéril os animais foram colocados em suas latas de PSP ou no tanque de plataformas múltiplas, ou permaneceram em suas caixas. Vinte e quatro horas após o início da PSP os animais foram submetidos à segunda injeção de ar estéril para manutenção da cavidade. A inflamação foi induzida 72 h após a última injeção de ar estéril com a administração de carragenina na bolha de ar (Fig. 10, esquema A). O conteúdo da bolha de ar e o sangue foram coletados e analisados 4 horas após a administração do estímulo inflamatório.

### 7.7.2 Pleurisia

Após 96 horas de PSP, através da técnica de PMM, injetou-se carragenina na região intratorácica dos animais CTRLcg e PSPcg para induzir a pleurisia. Duas ou quatro horas após o estímulo inflamatório, os animais CTRL, PSP, CTRLcg e PSPcg, foram anestesiados e sacrificados e o lavado da cavidade pleural foi obtido e analisado (Fig. 6, esquema B). Os animais que foram avaliados 24 h após o estímulo inflamatório receberam a injeção de carragenina 72 h após o início da PSP e tiveram seu lavado pleural analisado 24 h após a injeção (Figura 10, esquema B).

### 7.7.3 CLP

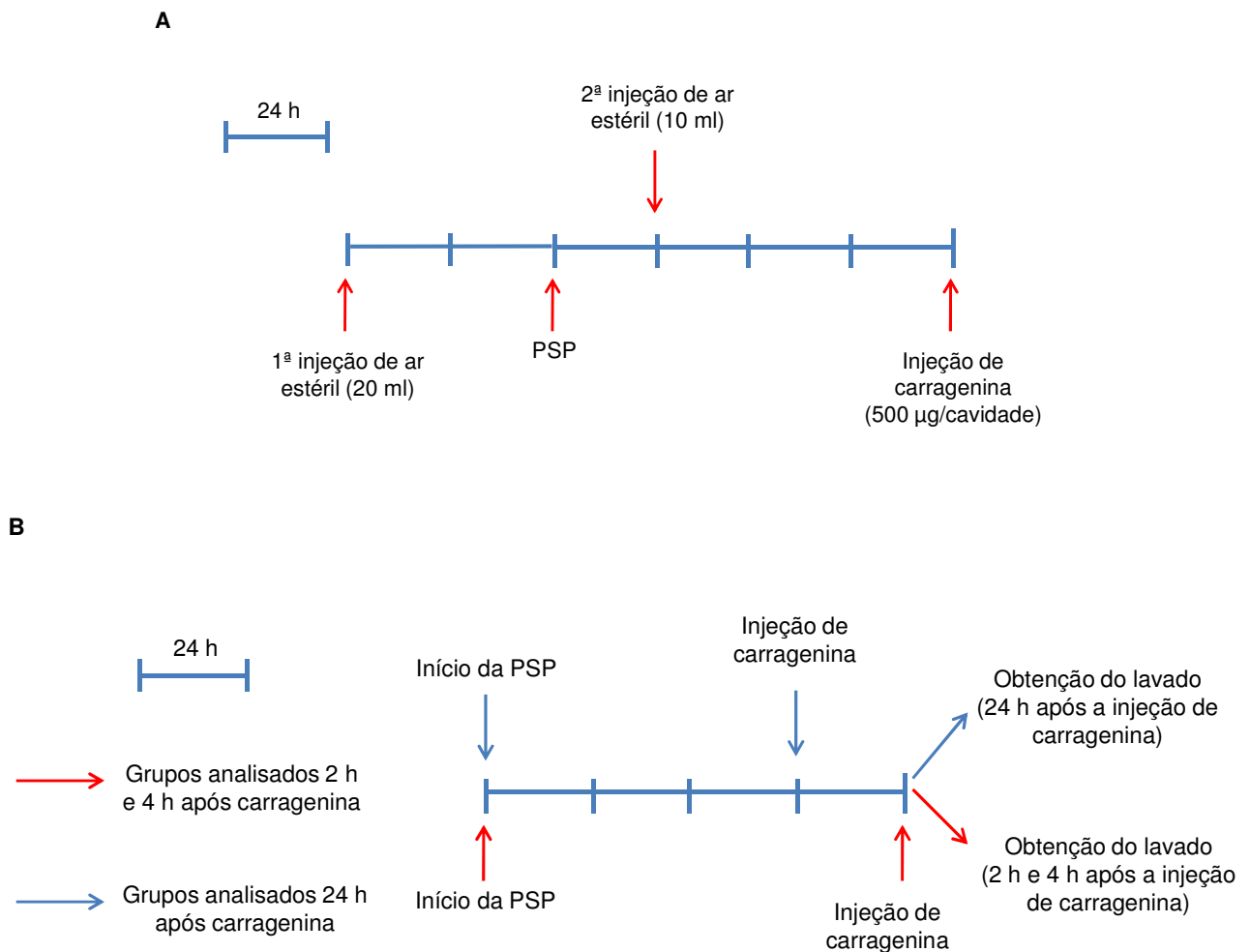
O CLP foi induzido em dois momentos diferentes: imediatamente após as 96 h de PSP e imediatamente antes de iniciar as 96 h de PSP. No primeiro ensaio os animais são privados de sono paradoxal por 96 h, através da técnica de PMM, e logo após o término do procedimento são submetidos ao CLP. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em caixas secas e sacrificados 6 h e 24 h após o CLP, ou eram mantidos em suas caixas por quatro dias para o acompanhamento da sobrevivência (Fig. 10, esquema C).

No segundo ensaio os animais eram submetidos ao CLP e colocados em caixas devidamente aquecidas, para retorno da anestesia. Aproximadamente 4 h após o procedimento cirúrgico e a completa recuperação dos animais, eles eram

colocados nos tanques de PSP e mantidos nessas condições por 96 h para o acompanhamento da sobrevida. Para avaliação de possíveis alterações da resposta inflamatória e, de acordo com a curva de sobrevivência, os animais foram sacrificados após 24 h de PSP (Fig. 10, esquema D).

#### 7.7.4 Teste da formalina

Imediatamente após 96 h de PSP, os animais receberam 10 µg/kg de ATL-1 i.v. Após dois minutos da administração esses animais receberam uma injeção intraplantar de formalina na pata direita traseira e foram colocados em um aparato acrílico para a observação dos comportamentos relacionados à dor por um período de 45 minutos (Fig. 10, esquema E).



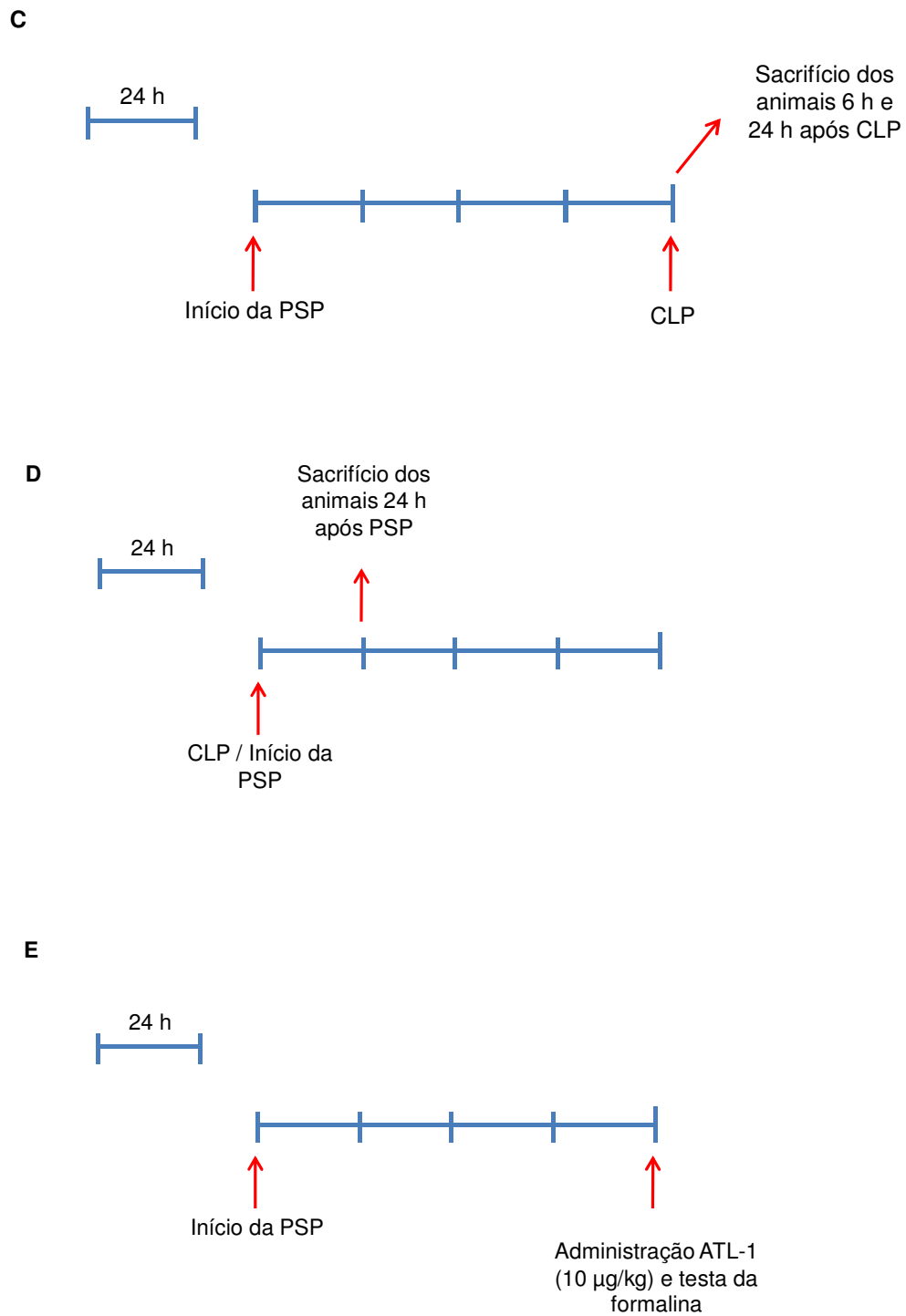


Figura 10: Esquemas representando os desenhos experimentais utilizados neste trabalho. (A) PSP e modelo da bolha de ar, (B) PSP e pleurisia, (C) PSP aplicada antes do CLP, (D) PSP aplicada após CLP, (E) teste da formalina.

## 7.8 Análise estatística

Todos os tratamentos estatísticos dos dados, assim como a plotagem dos gráficos, foram feitos com o auxílio do programa *GraphPad Prism 5* para *Windows*. Depois de verificada a normalidade e homogeneidade dos dados através do teste *Kolmogorov-Smirnov*, a comparação entre mais de dois grupos foi realizada utilizando-se o teste de análise de variâncias (*one-way ANOVA*), seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Para a comparação das curvas de sobrevivência foi utilizado o teste de *Mantel-Cox log rank*.

Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças onde o nível de significância era inferior ou igual a 0,05.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Caracterização da resposta inflamatória de animais privados de sono paradoxal submetidos ao modelo da bolha de ar

#### 8.1.1 PSP induzida pela técnica de múltiplas plataformas modificada

A resposta de animais PSP à administração de carragenina no modelo da bolha de ar foi caracterizada em função da análise do número de leucócitos no exsudato da cavidade (Fig. 11) e da contagem diferencial dessas células (Fig. 12).

Pode-se observar na figura 6 que, assim como esperado, os animais do grupo CTRLcg apresentaram um intenso recrutamento de leucócitos para a cavidade 4 h após a estimulação com carragenina (500 µg/cavidade) quando comparados ao grupo CTRL. Os animais PSP, que receberam PBS, apresentaram um padrão de migração celular semelhante ao observado nos animais do grupo CTRL. Já o grupo PSPcg apresentou aumento na celularidade comparado a seu respectivo grupo controle (PSP), mas quando comparado com o grupo CTRLcg não apresentou diferença significativa.

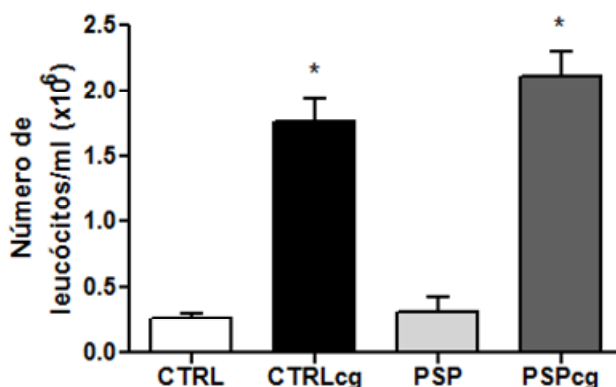


Figura 11: Número de leucócitos no lavado da bolha de ar 4 h após a administração de carragenina em ratos PSP através da técnica de MPM. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, n= 8 animais por grupo, \*  $p \leq 0,05$  vs respectivo controle (*one-way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*).

Observando o perfil dos leucócitos que migraram para a cavidade (Fig. 12), pode-se notar que os animais, de ambos os grupos, que receberam carragenina apresentaram uma redução do número de células mononucleares acompanhada de um aumento de neutrófilos, justificando o aumento observado no número de

leucócitos na cavidade. Entretanto a PSP não alterou a resposta observada. Uma pequena porcentagem de mastócitos e eosinófilos foi detectada em todos os grupos, porém sem nenhuma diferença estatística.

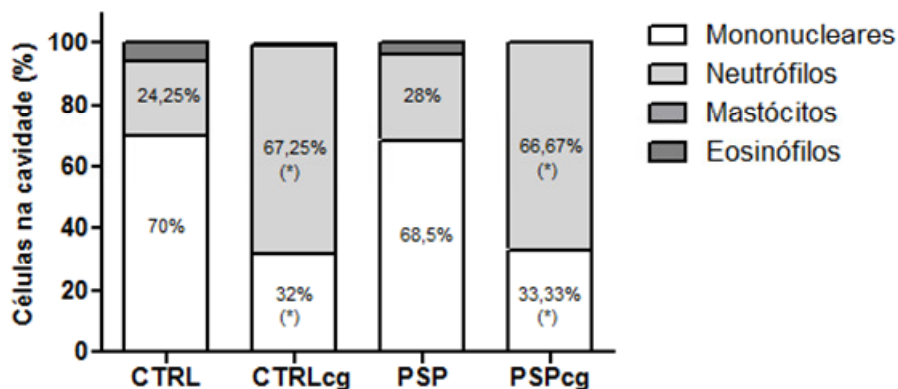


Figura 12: Contagem diferencial dos leucócitos presentes no lavado da bolha de ar em ratos PSP através da técnica de MPM. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão,  $n= 8$  animais por grupo, \*  $p\leq 0,05$  vs respectivo controle (*one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*).

Para investigar se os animais PSP e PSPcg poderiam apresentar alguma alteração no número de leucócitos sistêmicos, foi analisado o número de leucócitos do sangue. Na figura 8 pode-se observar que não existe diferença significativa no número de leucócitos sanguíneos entre os animais do grupo CTRL, CTRLcg, PSP e PSPcg.

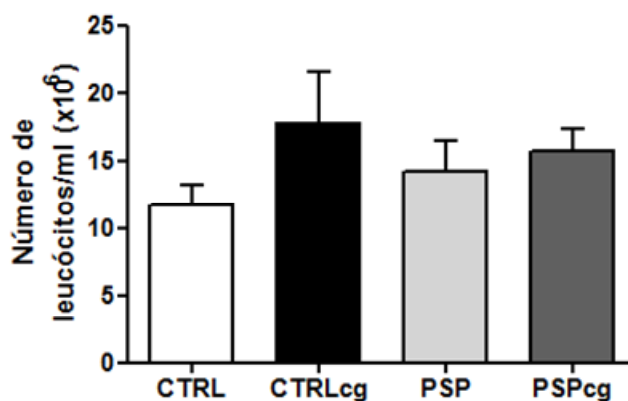


Figura 13: Número de leucócitos sanguíneos em ratos PSP, através da técnica de MPM, 4 h após a administração de carragenina na bolha de ar. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão,  $n=8$  animais por grupo (*one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*).

### 8.1.2 PSP induzida pela técnica de plataforma única (PU)

Utilizando-se a técnica de PU, os dados obtidos com relação ao recrutamento de leucócitos para a cavidade, bem como a contagem diferencial no exsudato foram

bastante semelhantes aos observados nos experimentos realizados utilizando-se a técnica de MPM. Observou-se um aumento no número de leucócitos (Fig. 14A), acompanhado por uma redução na percentagem de células mononucleares e um aumento de neutrófilos (Fig. 14B) no lavado da cavidade de animais que receberam carragenina, quando comparados aos seus respectivos controles. No entanto, a PSP não foi capaz de alterar a resposta inflamatória, uma vez que não houve diferença entre os grupos CTRL e PSP, bem como entre os grupos CTRLcg e PSPcg nos dois parâmetros observados (Fig. 14A e 14B). Mastócitos e eosinófilos foram detectados em todos os grupos, porém sem nenhuma diferença estatística. Com relação ao número de leucócitos sistêmicos circulantes também não foi observada diferença significativa entre os quatro grupos estudados (Fig. 14C).

## **8.2 Caracterização da resposta inflamatória de animais privados de sono paradoxal submetidos ao modelo da pleurisia**

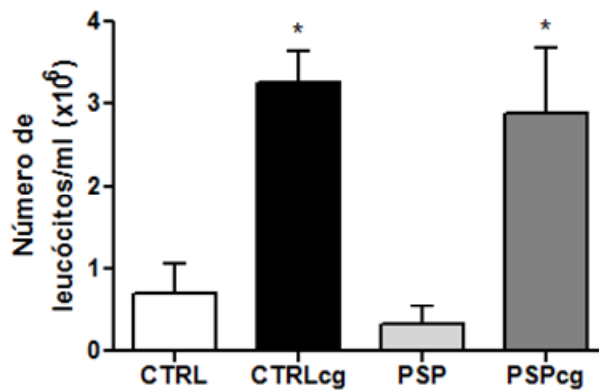
Pode-se observar na figura 15 que a injeção de carragenina na cavidade pleural dos ratos provocou uma resposta caracterizada pelo aumento no recrutamento de leucócitos para a cavidade e esse aumento ocorreu ao longo do tempo, alcançando o pico no tempo de 4 h, e mantendo o mesmo perfil até 24 h após a injeção de carragenina (Fig. 15A).

Os animais PSP que receberam PBS estéril apresentaram um padrão de migração celular semelhante ao observado nos animais do grupo CTRL nos três tempos observados. Tanto o grupo CTRLcg quanto o grupo PSPcg apresentaram um aumento na celularidade comparados a seus respectivos controles (CTRL e PSP) 2, 4 e 24 horas após a injeção de carragenina, mas quando comparados entre si não apresentaram diferença significativa.

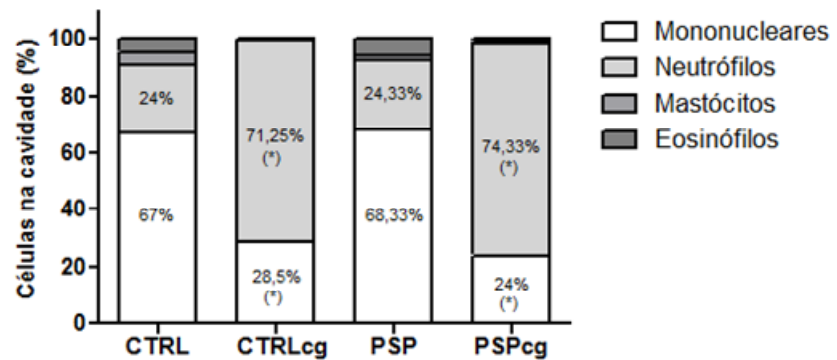
A contagem diferencial dos leucócitos que migraram para a cavidade pleural 2, 4 e 24 horas após o estímulo inflamatório (Fig. 15B, 15C e 15D respectivamente), mostrou que os neutrófilos estavam em maior quantidade tanto nos animais CTRLcg quanto nos animais PSPcg comparados a seus respectivos controles em todos os tempos observados. Além disso, as células mononucleares apresentaram um padrão de redução nesses mesmos grupos de animais, porém sem diferença entre CTRLcg e PSPcg. Uma pequena porcentagem de mastócitos e eosinófilos foi detectada em todos os grupos, mas sem nenhuma diferença estatística.



A



B



C

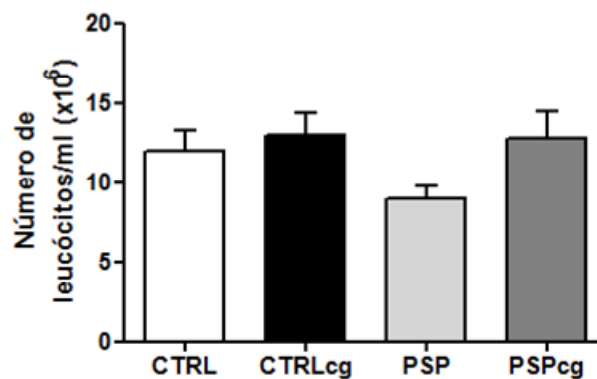


Figura 14: Caracterização da resposta inflamatória de animais PSP, através da técnica de PU, submetidos ao modelo da bolha de ar. Após 96 h de PSP os animais foram injetados com carragenina (500  $\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ), e 4 h após foram analisados o número (A) e os tipos de leucócitos (B) presentes no lavado da bolha de ar, além do número de leucócitos sistêmicos (C). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão,  $n= 8$  animais por grupo, \*  $p\leq 0,05$  vs respectivo controle (*one-way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*).

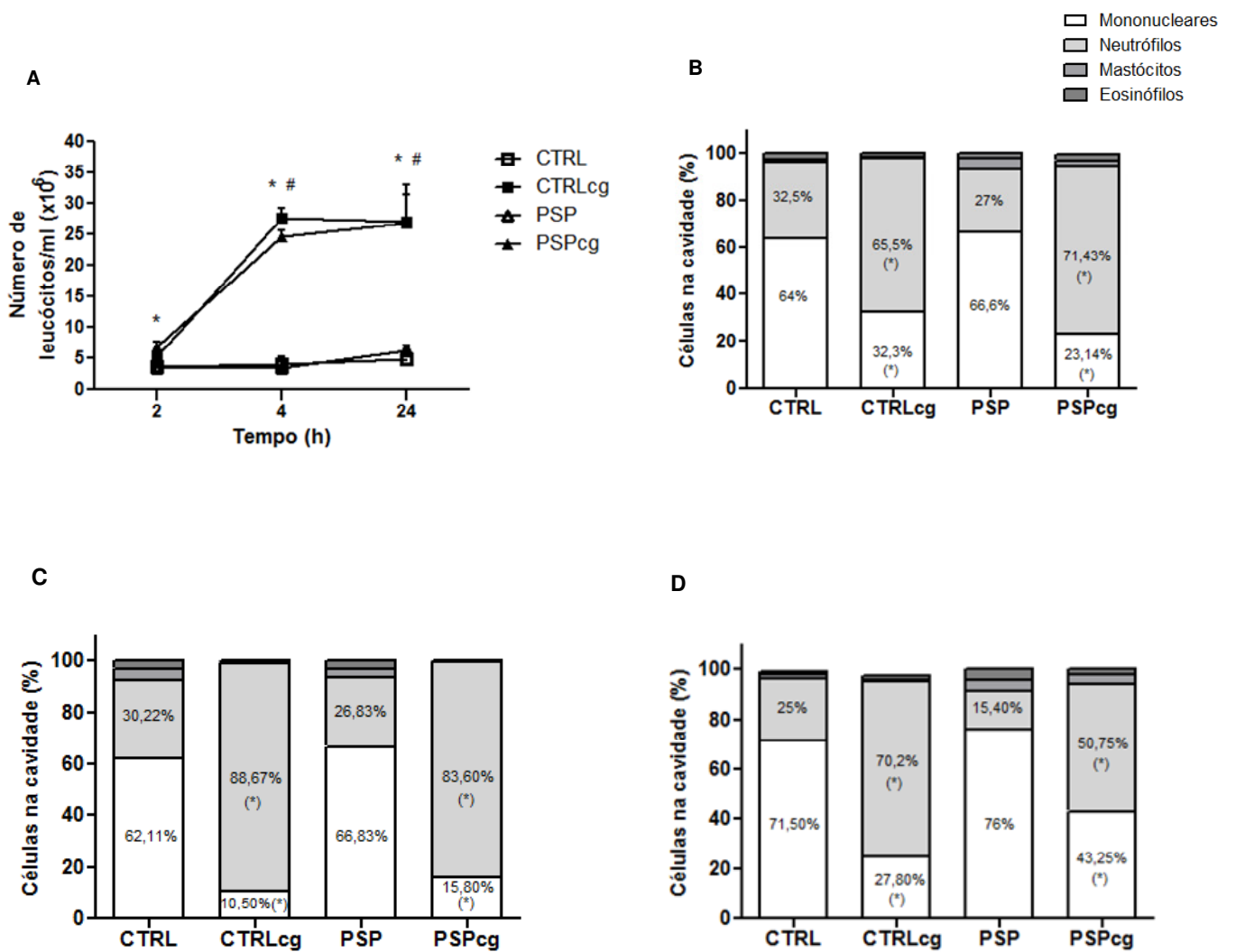


Figura 15: Curso temporal da resposta inflamatória de animais PSP por 96 h, através da técnica de MPM, submetidos à pleurisia induzida por carragenina. O recrutamento de leucócitos para a cavidade pleural foi avaliado 2, 4 e 24 h após a administração de carragenina (A), e foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos no exsudato 2 h (B), 4 h (C) e 24 h (D) após o estímulo com carragenina. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, n= 8 animais por grupo, \*  $p \leq 0,05$  vs respectivo controle; #  $p \leq 0,05$  vs próprio grupo no tempo de 2 h (*one-way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*).

Para determinar os níveis de alguns marcadores inflamatórios foram feitas dosagens plasmáticas das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nos grupos experimentais 4 h após a injeção de carragenina ou PBS estéril na cavidade torácica (Fig. 16A, 16B e 16C). Os resultados mostraram que, assim como, os animais CTRLcg, os animais PSP apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 (Fig. 16A), IL-1 $\beta$  (Fig. 16B) e TNF- $\alpha$  (Fig. 16C) plasmático quando comparados ao grupo CTRL. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  entre os animais PSP e PSPcg,

IL-6 e IL-1 $\beta$  foram dosadas também no lavado da cavidade torácica de animas PSP e CTRL submetidos à pleurisia (Fig. 17A e 17B). Nota-se um aumento tanto nos níveis de IL-6 (Fig. 17A) quanto IL-1 $\beta$  (Fig. 17B) nos animais CTRLcg e PSPcg quando comparados aos seus respectivos controles, porém não foi observada diferença significativa entre os dois grupos.

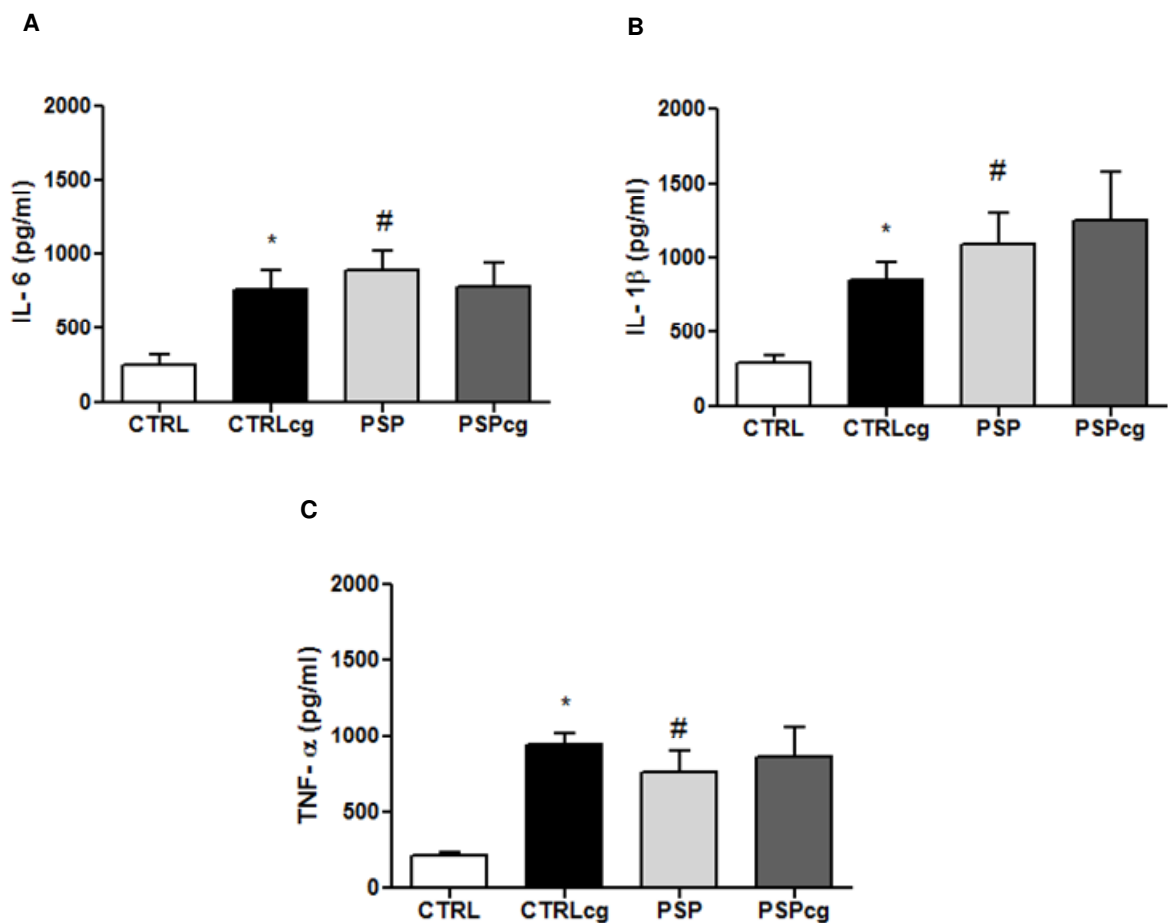


Figura 16: Quantificação dos níveis de IL-6 (A), IL-1 $\beta$  (B) e TNF- $\alpha$  (C) no plasma de animais PSP submetidos ao modelo da pleurisia 4 h após a injeção de carragenina. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, n= 8 animais por grupo, \*  $p \leq 0,05$  vs respectivo controle; #  $p \leq 0,05$  vs grupo CTRL (*one-way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*).

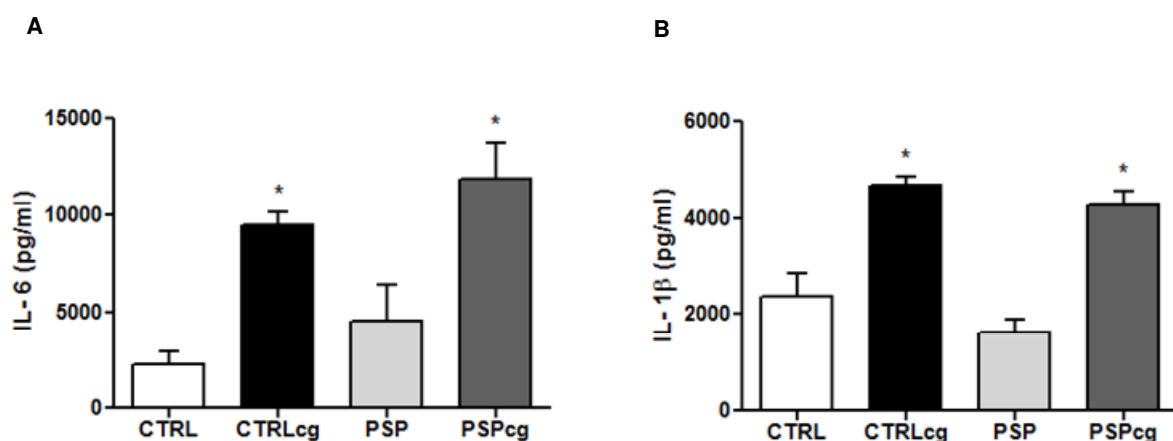


Figura 17: Quantificação dos níveis de IL-6 (A) e IL-1 $\beta$  (B) no exsudato pleural de animais PSP submetidos ao modelo da pleurisia 4 h após a injeção de carragenina. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, n= 8 animais por grupo, \*  $p \leq 0,05$  vs respectivo controle (*one-way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*).

### 8.3 Efeito da PSP na sobrevida, acúmulo de neutrófilos no exsudato e níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias em animais submetidos ao CLP

Avaliamos o impacto na sobrevida dos animais quando a PSP foi aplicada antes e depois da sepse. No primeiro protocolo, em que 96 h de PSP foram aplicadas aos animais antes da sepse (Fig. 18A), podemos observar que após 24 h do procedimento cirúrgico os animais do grupo CTRL<sub>CLP</sub> apresentaram 75% de sobrevida, enquanto que, neste mesmo período, os animais PSP<sub>CLP</sub> apresentaram uma sobrevida de 25%. Nas 24 h seguintes, a sobrevida dos animais CTRL<sub>CLP</sub> declinou para 56,25% mantendo-se nesses valores até 96 h. Já os animais PSP<sub>CLP</sub>, nas 24 h seguintes mantiveram a sobrevida em 25%, chegando a 100% de mortalidade 72 h após o CLP. Os animais dos grupos CTRL<sub>SHAM</sub> e PSP<sub>SHAM</sub> apresentaram 100% de sobrevida ao longo de todo período experimental (96 h).

A quantificação dos neutrófilos que migraram para a cavidade abdominal foi feita 6 h e 24 h após a indução do CLP (Fig. 18B e 18C). Pode-se observar que 6 h após o CLP (Fig. 18B), os animais submetidos ao procedimento cirúrgico apresentaram um aumento no recrutamento de neutrófilos para a cavidade em relação aos seus respectivos controles, porém nenhuma diferença foi observada entre os animais controle e PSP. O mesmo padrão foi observado 24 h após o CLP (Fig. 18C).

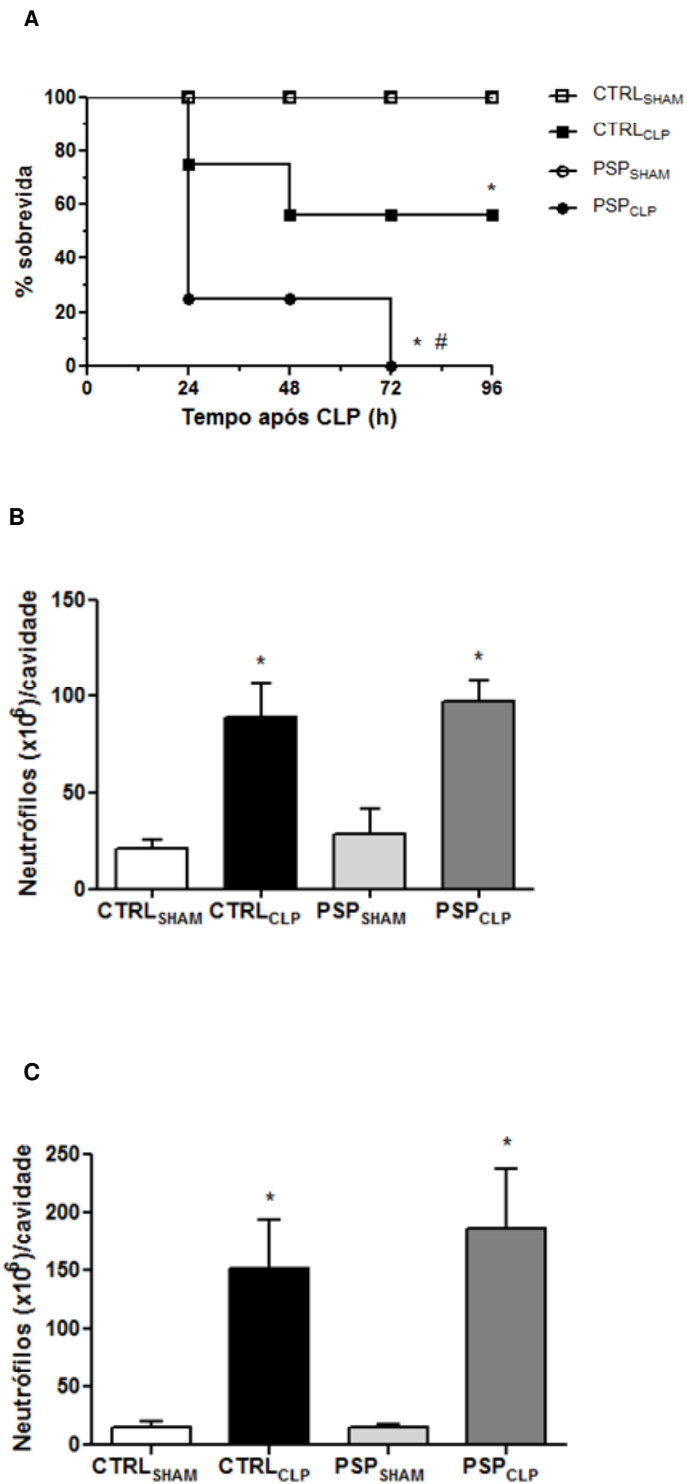


Figura 18: Efeito da PSP aplicada antes da sepse na sobrevivida (A) e na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, 6 h (B) e 24 h (C) após a indução do CLP. Os resultados estão expressos como porcentagem de sobrevivida (\*  $p \leq 0,05$  vs respectivo controle; #  $p \leq 0,05$  vs CTRL<sub>CLP</sub>, teste *Mantel-Cox long rank*,  $n=8$  animais/grupo), e como média  $\pm$  erro padrão (\*  $p \leq 0,05$  vs respectivo controle; *One-way ANOVA* seguido de teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*,  $n= 6$  a  $8$  animais por grupo).

As dosagens de IL-6 mostraram níveis plasmáticos aumentados 6 h após o procedimento cirúrgico (Fig. 19A) nos animais CLP quando comparados a seus respectivos controles. Além disso, pode-se notar que a PSP, *per se*, foi capaz de elevar os níveis de IL-6 nos animais *sham*, e mostrou um efeito sinérgico nos animais CLP, já que este grupo apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo CTRL<sub>CLP</sub>. Vinte e quatro horas após o CLP os níveis séricos de IL-6 continuaram aumentados nos animais CTRL<sub>CLP</sub> e nos animais PSP<sub>SHAM</sub> em comparação ao grupo CTRL<sub>SHAM</sub> (Fig. 19D).

Os níveis de IL-1 $\beta$  estavam aumentados nos animais CTRL<sub>CLP</sub> 6 h (Fig. 19B) após a indução da sepse, porém nenhuma outra diferença estatística foi observada entre os demais grupos estudados. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos 24 h após o CLP (Fig. 19E). O mesmo padrão foi observado para os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  6 h e 24 h após o CLP (Fig. 19C e 19F, respectivamente).

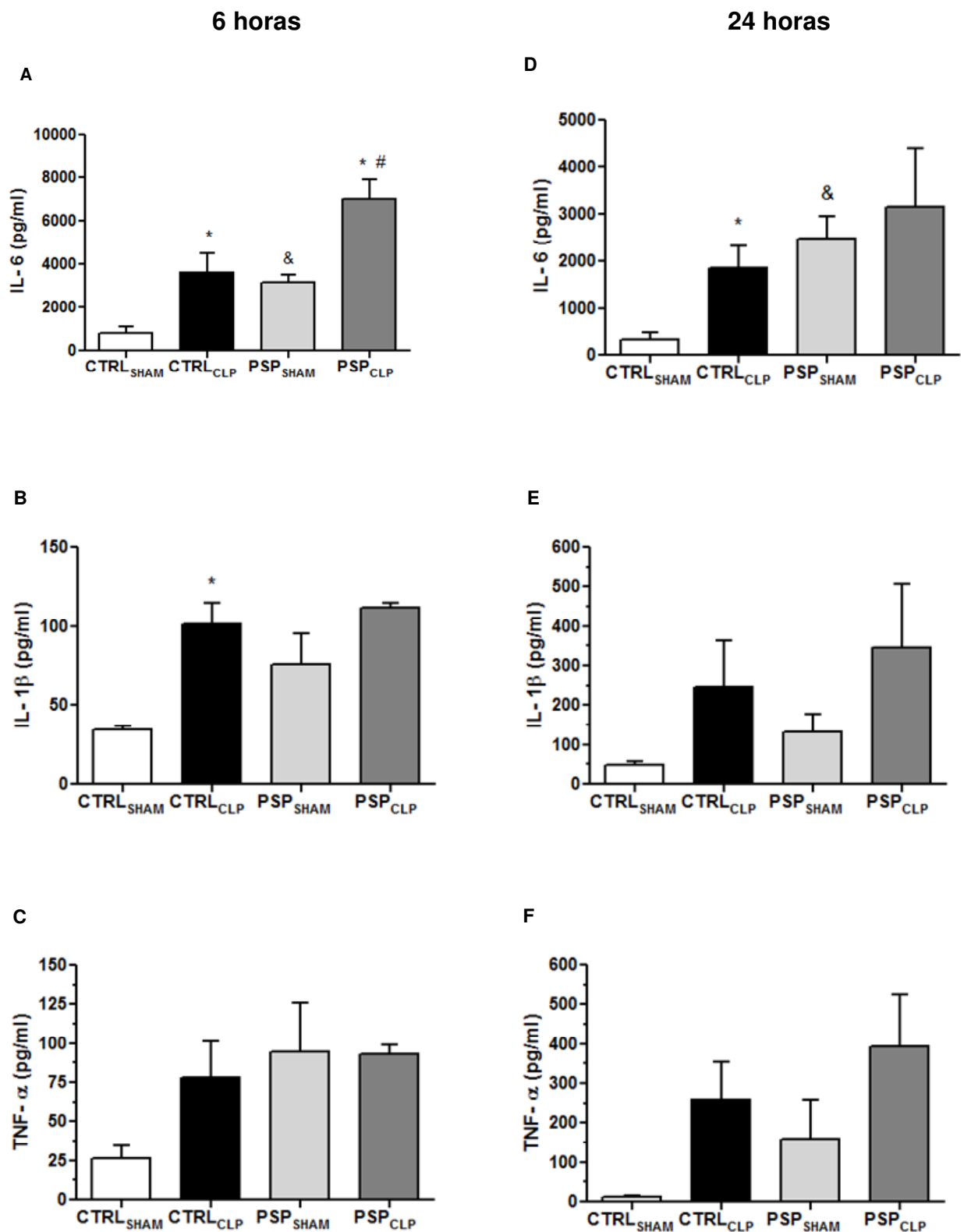


Figura 19: Dosagens plasmáticas dos níveis de IL-6, IL-1β e TNF-α em animais PSP por 96 h e posteriormente submetidos ao CLP. As dosagens foram feitas 6 h (A, B e C) e 24 h (D, E e F) após o CLP. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão, n= 5 a 7 animais por grupo, \* p≤0,05 vs respectivo controle; # p≤0,05 vs CTRL<sub>CLP</sub>, & p≤0,05 vs CTRL<sub>SHAM</sub>. (one-way ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls).

Em um segundo protocolo, avaliamos o impacto da PSP aplicada após a sepse. Na figura 20A pode-se observar que após 24 h do procedimento cirúrgico, para os grupos controle, e após 24 h da PSP, para os grupos privados, os animais do grupo CTRL<sub>CLP</sub> apresentaram 75% de sobrevivência, enquanto neste mesmo período, os animais PSP<sub>CLP</sub> apresentaram uma sobrevivência de 53,3%. Após 48 h, a sobrevivência dos animais CTRL<sub>CLP</sub> declinou para 56,25% mantendo-se nesses valores até 96 h. Já os animais PSP<sub>CLP</sub>, apresentaram 100% de mortalidade após 48 h de PSP. Os animais dos grupos CTRL<sub>SHAM</sub> e PSP<sub>SHAM</sub> apresentaram 100% de sobrevivência ao longo de todo período em que esta foi acompanhada (96 h).

A quantificação dos neutrófilos que migraram para a cavidade abdominal foi feita 24 h após a indução do CLP, para os grupos controle, e após 24 h de PSP, para os grupos privados. Vinte e quatro horas após o CLP (Fig. 20B), os animais submetidos ao procedimento (controles e privados) apresentaram um aumento no recrutamento de neutrófilos para a cavidade em relação aos grupos *sham*, porém nenhuma diferença foi observada entre os animais CTRL e PSP.

A figura 15 mostra os níveis séricos de IL-6 (Fig. 21A), IL-1 $\beta$  (Fig. 21B) e TNF- $\alpha$  (Fig. 21C) em animais submetidos ao CLP e logo em seguida PSP por 24 h. Os animais dos grupos CLP apresentaram um aumento de IL-6 e IL-1 $\beta$ , independente da PSP, quando comparados a seus respectivos controles. Os níveis de TNF- $\alpha$  estavam aumentados apenas no grupo CTRL<sub>CLP</sub>.



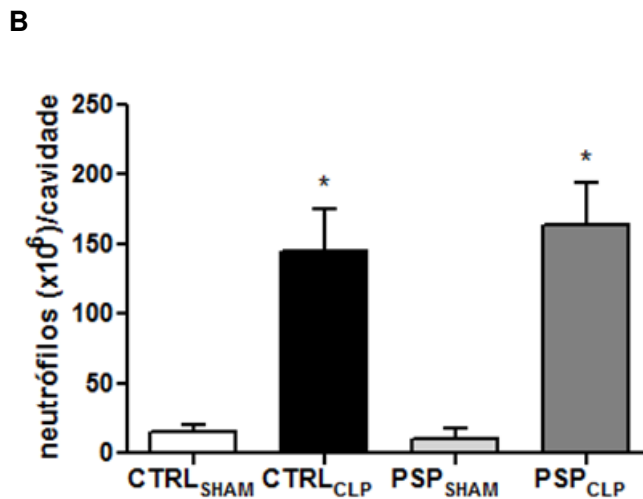
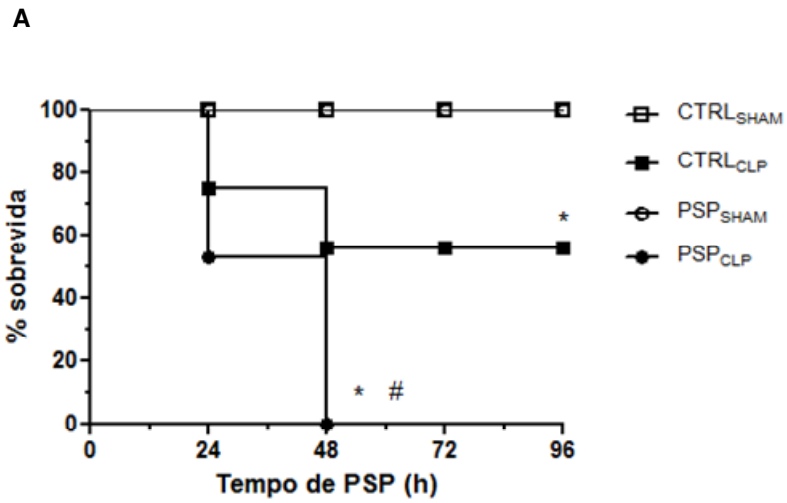
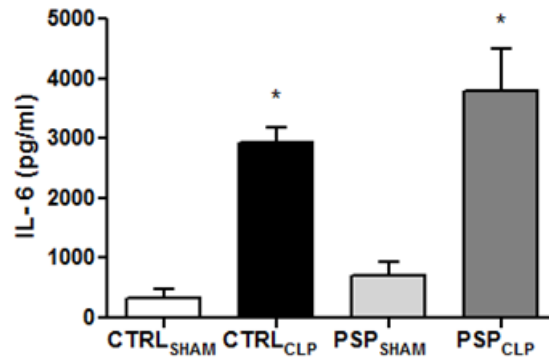
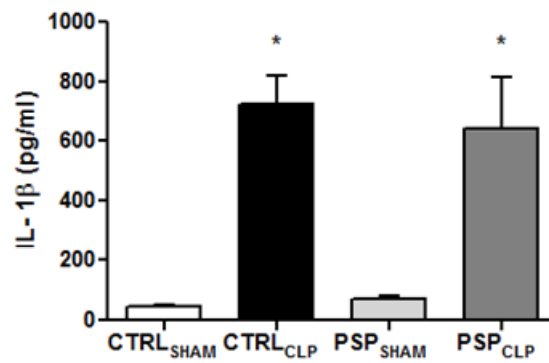


Figura 20: Efeito da PSP, aplicada após a sepse, na sobrevivida (A) e na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal 24 h após a PSP (B). Os resultados estão expressos como porcentagem de sobrevivida (\*  $p \leq 0,05$  vs respectivo controle; #  $p \leq 0,05$  vs CTRL<sub>CLP</sub>, teste *Mantel-Cox long rank*,  $n = 8$  animais/grupo), e como média  $\pm$  erro padrão (\*  $p \leq 0,05$  vs respectivo controle; *one-way ANOVA* seguido de teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*,  $n = 5$  a 7 animais/grupo).

A



B



C

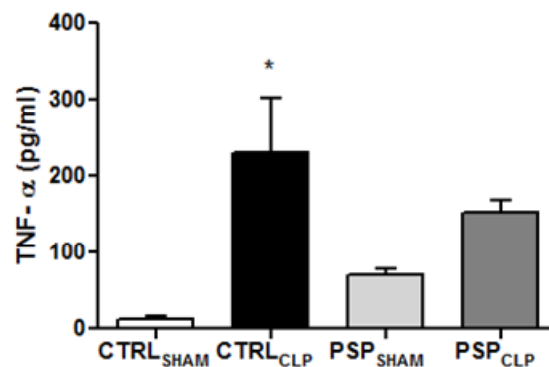


Figura 21: Dosagens plasmáticas dos níveis de IL-6 (A), IL-1β (B) e TNF-α (C) em animais submetidos ao CLP e posteriormente PSP por 24 h. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão, n= 5 a 7 animais por grupo, \*  $p \leq 0,05$  vs respectivo controle (*one-way* ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*).

#### **8.4 Efeito do tratamento agudo com ATL-1 na hipernocicepção induzida por 96 h de PSP no teste da formalina**

Imediatamente após a injeção intraplantar de formalina uma resposta pronunciada foi observada durante os 5 minutos seguintes à injeção (fase I) (Fig. 22). Nesta fase, também conhecida como fase neurogênica, os ratos submetidos à PSP apresentaram um maior número de comportamentos relacionados à dor quando comparados aos animais controles ( $80,63 \pm 4,702$  vs  $59,27 \pm 6,484$ ,  $p \leq 0,05$ ). O tratamento com ATL-1 não foi capaz de reduzir o número de comportamentos relacionados à dor nos grupos  $PSP_{ATL}$  ( $80,63 \pm 4,702$  vs  $70,14 \pm 4,621$ ,  $p > 0,05$ ) e  $CTRL_{ATL}$  ( $59,27 \pm 6,484$  vs  $54,33 \pm 6,075$ ,  $p > 0,05$ ).

Dentro do intervalo de 5 a 15 minutos após a injeção de formalina, todos os grupos apresentam uma redução do número de comportamentos associados à dor quando comparados à fase I. A partir de 15 até 30 minutos após a injeção de formalina os animais dos grupos CTRL e PSP apresentaram um aumento do número de comportamentos que após 30 minutos começou a declinar até o final do experimento (45 minutos).

Durante a fase II, também conhecida como fase inflamatória, os animais PSP apresentaram um maior número de comportamentos relacionados à dor em praticamente todos os intervalos desta fase, quando comparados aos animais controles. Nesta fase, o tratamento com ATL-1 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) reduziu o número de comportamentos associados à dor, a partir de 20 minutos após a injeção de formalina e até o final do experimento. Além disso, em relação ao grupo CTRL, no intervalo de 25 a 30 minutos após a injeção de formalina, o tratamento com ATL-1 reduziu também o número de comportamentos relacionados à dor ( $68,73 \pm 5,142$  vs  $46,50 \pm 7,018$ ,  $p \leq 0,05$ ).

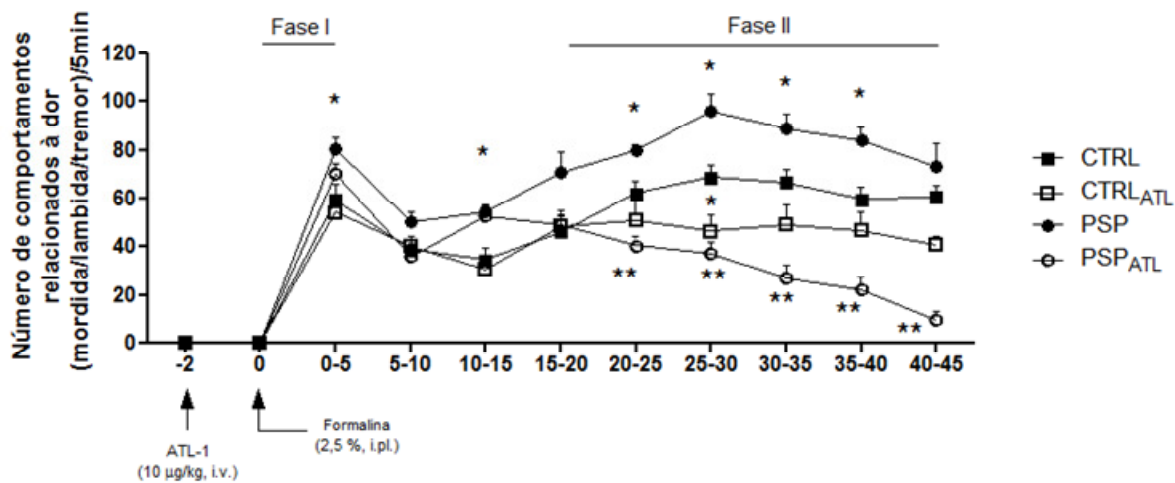


Figura 22: Número de comportamentos relacionados à dor após injeção intraplantar de formalina em animais controles e PSP tratados ou não com ATL-1 (10 µg/kg, i.v.) durante um período de 45 minutos de observação. Os valores estão expressos como médias ± erro padrão da média, n= 6/grupo, \* p≤0,05 vs grupo CTRL; \*\* p≤0,05 vs grupo PSP (*one-way* ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls* para cada intervalo de 5 minutos).

## 9 DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos o efeito de 96 h de PSP na resposta inflamatória de ratos submetidos a modelos de inflamação aguda, ou seja, os modelos da bolha de ar e da pleurisia, ambos utilizando a carragenina como agente flogístico. Além disso, avaliamos o efeito da PSP na sobrevivência e no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório antes e após a indução do CLP. Outra vertente do trabalho foi investigar o possível efeito analgésico de um análogo de lipoxina (ATL-1) na hipernocicepção induzida por 96 h de PSP.

No primeiro grupo de experimentos avaliamos o efeito de 96 h de PSP no recrutamento de leucócitos de animais submetidos ao modelo da bolha de ar. Observamos um aumento no número de leucócitos que chegaram à cavidade 4 h após receberem a injeção de carragenina. O influxo de leucócitos do sangue ao local da inflamação desempenha um papel importante na resposta inflamatória não apenas devido a sua função fagocítica, mas também pela produção e liberação de mediadores químicos (Saleh e col., 1996; Penido e col., 2006).

Em nossos experimentos o aumento do número de leucócitos, observado nos animais que receberam carragenina, foi consequência de um aumento na quantidade de polimorfonucleares neutrófilos e uma redução de mononucleares no exsudato inflamatório. Os neutrófilos são as primeiras e mais abundantes células a chegar ao local da injúria, e por isso são reconhecidos como a primeira linha de defesa do organismo. A infiltração local de neutrófilos é bem característica da resposta inflamatória induzida pela carragenina (Di Rosa e Sorrentino, 1968; Vinegar e col., 1973).

Apesar do aumento do número de leucócitos ter sido observado nos grupos experimentais que receberam carragenina (CTRLcg e PSPcg), não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos Controle e PSP. Ou seja, a migração de leucócitos para o sítio inflamatório induzida pela carragenina não foi alterada por 96 h de PSP.

O início da resposta inflamatória se caracteriza pela fase vascular onde se observa a mudança no calibre e fluxo da microcirculação levando a vasodilatação e, além disso, aumento da permeabilidade vascular com consequente formação de exsudato rico em proteínas e edema local. Dados preliminares sobre a avaliação de parâmetros da fase vascular no modelo da bolha de ar sugerem que a PSP não influencia essa fase inicial da resposta inflamatória.

Outro parâmetro avaliado em nosso estudo foi o número de leucócitos sistêmicos nos animais submetidos ao modelo da bolha de ar. Nossos resultados não mostraram diferença entre os animais CTRL e PSP, e os seus respectivos grupos que receberam carragenina, 4 h após a indução do modelo experimental. O número e a proporção de leucócitos no sangue e em vários órgãos fornecem uma representação importante da distribuição de leucócitos no corpo e do estado de ativação do sistema imune. Nossos resultados estão de acordo com dados encontrados na literatura, onde ratos submetidos à PSP por 96 h não apresentaram diferença significativa com relação ao número de leucócitos sanguíneos quando comparados a animais que tiveram sono normal (Zager e col., 2007). Foi encontrado resultado semelhante em camundongos PSP por 72 h (Zager e col., 2012). Porém, este mesmo grupo demonstrou que, quando os animais eram injetados intraperitonealmente com LPS (1 µg e 5 µg/animal), tanto animais controle quanto PSP, apresentavam uma redução no número de leucócitos no sangue, 2 h após a administração de LPS, comparados a seus respectivos controles. Contudo, deve-se levar em consideração que tanto o agente flogístico quanto o modelo de inflamação são diferentes neste caso, o que poderia explicar as divergências encontradas. Everson, em 2005, mostrou que ratos submetidos à privação de sono, através do método do disco sobre a água, apresentaram alterações em células imunes circulantes. No entanto na metodologia adotada neste trabalho, o animal precisa se mover para manter-se acordado, e a atividade física pode ter sido uma variável importante.

Em nosso trabalho utilizamos a técnica de MPM e a técnica de PU. Na MPM os animais são submetidos à privação de sono em grupo. O mesmo grupo de animais mantidos juntos durante todo o crescimento é colocado no tanque de privação. A segunda técnica consiste da privação de sono de forma individual, onde os animais são mantidos individualizados nas latas de privação de sono. Ambas as técnicas, MPM e PU, produzem a supressão total da fase paradoxal de sono, mas também resultam em uma redução da fase NREM (31% e 37%, respectivamente) (Mendelson e col., 1974; Grahnstedt e col., 1985). No entanto, apesar do sono NREM ser afetado durante o período de privação, esses animais não apresentam diferenças com relação ao rebote dessa fase de sono quando comparados aos seus controles, sugerindo que a perda dessa fase durante o período de privação não é suficiente para produzir alterações fisiológicas como um mecanismo compensatório.

Com o intuito de eliminar a hipótese de que os resultados obtidos na resposta inflamatória aguda de animais PSP submetidos ao modelo da bolha de ar eram consequência de possíveis interferências do método utilizamos duas técnicas em nosso trabalho. A técnica de PU, descrita em 1964 por Jouvét, primeiramente em gatos e posteriormente adaptada para ratos, em 1965, por Cohen e Dement, é uma metodologia clássica e reproduzível, já utilizada em nosso laboratório e originou diversas publicações.

Os resultados obtidos com a PU confirmam os dados anteriores e, além disso, indicam que a técnica de MPM, adotada recentemente pelo nosso grupo de pesquisa, apresenta confiabilidade e reproduzibilidade, assim como a técnica de PU, já que a mudança da metodologia utilizada para induzir PSP não levou a alterações nos resultados observados.

Além da utilização da carragenina, outros dois agentes flogísticos como o glicogênio de ostra e o zymosan, são bastante utilizados em modelos experimentais de inflamação. Na tentativa de avaliar possíveis alterações na resposta inflamatória de animais PSP induzida por agentes flogísticos diferentes da carragenina, alguns animais foram testados para avaliação do recrutamento de leucócitos em resposta a esses dois agentes. No entanto, os resultados obtidos mostraram que apesar de ambos produzirem uma intensa migração de leucócitos para o sítio inflamatório, a resposta dos grupos de animais PSP-glic ou PSP-zymosan não apresentou diferença significativa daquela observada nos animais CTRL-glic ou CTRL-zymosan, respectivamente.

Escolhemos ainda testar outro modelo de inflamação aguda para corroborar os resultados encontrados no modelo da bolha de ar. A carragenina quando injetada na cavidade pleural causa lesão tecidual e uma inflamação local chamada de pleurisia (Vinegar e col., 1973). A pleurisia induzida pela carragenina foi originalmente desenvolvida para uma análise quantitativa e temporal do acúmulo de células inflamatórias e exsudato (Vinegar e col., 1973). A resposta inflamatória induzida pela carragenina é bifásica, caracterizada por uma fase aguda (4 h) e uma crônica (48 h), com diferentes mediadores e eventos envolvidos, e é um dos modelos de inflamação aguda mais bem caracterizados. A formação do exsudato é seguida pela infiltração de neutrófilos, monócitos e linfócitos para a cavidade (Di Rosa, 1972; Murai e col., 2003). As células do exsudato são programadas para sofrer apoptose, o que limita a resposta inflamatória e restabelece a homeostase

(Grigg e col., 1991; Hussain e col., 1998). A resposta induzida pelo modelo da pleurisia é um pouco diferente daquela observada no modelo da bolha de ar. Como se trata de uma cavidade fisiológica, e que conta com a presença de células residentes, o exsudato apresenta uma quantidade maior de leucócitos. Isso pode ser facilmente observado se compararmos o número total de leucócitos no exsudato de animais submetidos ao modelo da bolha de ar e aqueles submetidos à pleurisia. Essa diferença na resposta inflamatória observada na pleurisia poderia permitir que observássemos uma resposta diferente nos animais PSP quando submetidos a esse modelo.

Após duas, quatro e vinte e quatro horas da injeção de carragenina foi feita a caracterização da resposta inflamatória aguda através da avaliação da celularidade e da composição celular encontrada no exsudato, além das dosagens de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no plasma e no exsudato. Estes pontos temporais foram escolhidos com o objetivo de observar alguma alteração na resposta aguda em dois momentos diferentes, no início (2 h e 4 h) ou em seu ponto máximo (24 h).

Nossos resultados mostraram que o número total de leucócitos que chegaram à cavidade pleural após a injeção de carragenina aumentou em função do tempo e alcançou seus valores máximos no tempo de 24 h, independente da PSP. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura que mostram esse efeito temporal no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório no modelo da pleurisia, tendo seu ponto máximo no tempo de 24 h e retornando a valores normais apenas 72 h após a injeção de carragenina (Iwata e col., 2010). Outros autores mostraram que o pico de leucócitos no exsudato de ratos submetidos à pleurisia ocorreu 48 h após a administração de carragenina (Ashok e col., 2004).

Assim como no modelo da bolha de ar, o infiltrado de leucócitos na cavidade pleural foi composto principalmente por neutrófilos nos três tempos observados, com exceção do grupo PSPcg no tempo de 24 h que apresentou um aumento no percentual de neutrófilos e a composição do lavado apresentou uma proporção bastante semelhante de neutrófilos e células mononucleares. Um dos eventos chave que iniciam o processo de resolução da inflamação é a apoptose de neutrófilos, que ocorre entre 8 h e 20 h (Akgul e col., 2001; Maianski e col., 2004). Os monócitos iniciam um influxo em direção ao foco inflamatório, onde se diferenciam em macrófagos e são responsáveis por fagocitar células apoptóticas, além de iniciar a



síntese e a liberação de mediadores com propriedades anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- $\beta$  (Gilroy e col., 2004; Sawatzky e col., 2006; Riley e col., 2006).

Nossos resultados sugerem que os animais PSPcg no tempo de 24 h podem estar apresentando um aumento na apoptose de neutrófilos acompanhado de um maior influxo de monócitos para o sítio inflamatório. Porém como não fizemos ensaios especificamente relacionados ao processo de apoptose, não podemos afirmar que esse resultado represente de fato alguma alteração na apoptose de neutrófilos.

A dosagem plasmática das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , 4 h após a indução da pleurisia, mostrou um aumento nos níveis desses marcadores no grupo PSP por 96 h. Esses dados sugerem que a PSP, *per se*, induziu uma resposta inflamatória. Nossos resultados se assemelham aos observados por Yehuda e colaboradores (2009) que observaram aumento nos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-17, em ratos, após 72 h de PSP. Em humanos também foi relatado esse padrão de aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias após períodos de privação de sono (Vgontzas e col., 1999; Shearer e col., 2001; Vgontzas e col., 2004). Irwin e colaboradores (2006) mostraram ainda um aumento dos níveis de RNAm para IL-6 e TNF- $\alpha$  em monócitos isolados de indivíduos privados de sono por um período de 4 h.

Citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são capazes de induzir alterações no perfil de neutrófilos, aumentando a degranulação dessas células, ativando sistemas enzimáticos e a quimiotaxia (Otsuka e col., 1990; Hechtman e col., 1991; Dunzendorfer e col., 1997; Condliffe e col., 1998; Tavare-Murta e col., 1998; Dewas e col., 2003; Alves-Filho e col., 2005). Em nossos experimentos, apesar da PSP ter aumentado os níveis dessas citocinas, esse aumento não estava diretamente relacionado a alterações na quimiotaxia de neutrófilos tanto no modelo da bolha de ar quanto na pleurisia.

No exsudato pleural a IL-6 e IL1 $\beta$  estavam aumentadas 4 h após o estímulo com carragenina nos grupos CTRLcg e PSPcg. Utsunomiya e colaboradores (1991) mostraram que TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 são citocinas produzidas no exsudato de ratos submetidos à pleurisia induzida por carragenina nos estágios iniciais da resposta, e induzem quimiotaxia para granulócitos. A migração de leucócitos para o sítio inflamatório, por sua vez, induz a produção de mais citocinas além de outros

mediadores (Utsunomiya e col., 1998). Keane e Strieter (2000) mostraram ainda que a geração de TNF, IL-6 e MCP-1 no exsudato pleural coincide com o aumento no volume do exsudato e o aumento do número de leucócitos, sugerindo o envolvimento dessas citocinas no desencadeamento da resposta inflamatória e o subsequente infiltrado de neutrófilos. Utsunomiya e colaboradores (1998) mostraram que TNF- $\alpha$  é capaz de induzir a produção da citocina indutora de quimiotaxia em neutrófilos (CINC), um potente quimioatraente para neutrófilos em um modelo de pleurisia induzida por zymosan. Puneet e colaboradores (2005) sugerem que os prováveis tipos celulares responsáveis pela produção dessas citocinas sejam células residentes, principalmente monócitos e ainda neutrófilos que migraram em direção à cavidade pleural, já que o nível dessas citocinas é rapidamente aumentado e ocorre em paralelo com o marcado influxo de neutrófilos (Puneet e col., 2005).

Nossos dados estão de acordo com dados da literatura já que os níveis de citocinas avaliados 4 h após o estímulo com carragenina foram acompanhados pelo recrutamento de leucócitos para a cavidade pleural sugerindo participação de células residentes e neutrófilos recrutados, como os principais produtores dessas citocinas, além da participação direta dessas citocinas no recrutamento de neutrófilos.

Outra abordagem do trabalho foi avaliar o efeito da PSP sobre a resposta de animais submetidos a um modelo de sepse. O modelo de escolha foi o CLP, onde é realizada a ligadura e perfuração do ceco com liberação da flora bacteriana. Neste modelo a resposta inflamatória é induzida por agentes microbianos, diferente da resposta induzida nos modelos da bolha de ar e da pleurisia, onde o agente flogístico (carragenina) é responsável por induzir essa resposta. O CLP é o modelo experimental que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos, decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. Após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (Brooks e col., 2007).

Quando 96 h de PSP foram aplicadas antes do CLP observamos uma redução na sobrevivência de animais PSP, alcançando 100% de mortalidade 72 h após a indução do modelo. Para avaliar as possíveis causas envolvidas nessa diferença, observamos o perfil do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal nesses animais.

Dentre as disfunções imunológicas descritas durante a sepse, a inibição da capacidade migratória de neutrófilos parece ter uma importante contribuição para a evolução clínica do paciente (Alves-Filho e col., 2008; Reddy e Standiford, 2010). O grau de hiporresponsividade dos neutrófilos se correlaciona diretamente com o agravamento do quadro clínico e com um prognóstico desfavorável por impedir o influxo de neutrófilos para o tecido e a eficiente eliminação do foco primário de infecção (Tavares-Murta e col., 2002). Da mesma maneira, animais submetidos ao CLP letal, correspondente a uma sepse grave, apresentam diminuição importante da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, acompanhada de uma redução na sobrevida (Benjamim e col., 2000; Benjamim e col., 2002).

Neste trabalho escolhemos utilizar o modelo de CLP subletal, correspondente a uma sepse moderada, em que se observa uma intensa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal com uma taxa de sobrevivência dos animais maior comparada ao modelo de CLP letal (Torre-Dueñas e col., 2006). Para verificar se a redução na sobrevida dos animais PSP estaria relacionada a uma possível falência na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, esses animais foram sacrificados 6 h e 24 h após o CLP. Nossos resultados não indicaram diferença entre os grupos CTRL<sub>CLP</sub> e PSP<sub>CLP</sub>, ambos apresentaram um aumento similar no recrutamento de neutrófilos 6 h e 24 h após o CLP, mostrando que ambos os grupos foram hábeis em restringir a infecção à cavidade peritoneal.

A PSP, *per se*, foi capaz de aumentar os níveis de IL-6 induzindo um efeito sinérgico nos animais PSP submetidos ao CLP, que apresentaram um aumento ainda maior nos níveis sistêmicos de IL-6 6 h após a indução do modelo de sepse. A presença de citocinas pró-inflamatórias no foco inflamatório induz a migração de neutrófilos, no entanto a presença dessas citocinas em altas concentrações na circulação inibe a migração de leucócitos em direção ao foco infeccioso. Já foi demonstrado que a administração intravenosa de TNF- $\alpha$  ou IL-8 é capaz de inibir a migração induzida pela injeção peritoneal de tioglicolato (Tavares-Murta e col., 1998). No entanto, em nossos resultados, os altos níveis de IL-6 encontrados no plasma dos animais PSP<sub>CLP</sub> não alteraram o padrão de migração de leucócitos em direção ao foco inflamatório. Os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , apesar de não terem apresentado diferença estatística entre os grupos, mostraram um padrão bastante semelhante ao observado em relação aos níveis de IL-6.

Essas citocinas também são responsáveis pela ativação de leucócitos, principalmente neutrófilos. O aumento de citocinas pró-inflamatórias no plasma de animais PSP poderia estar relacionado a uma mudança no perfil de ativação dessas células e não diretamente envolvido no recrutamento celular. Porém em função de dificuldades metodológicas encontradas para o isolamento de neutrófilos em ratos, não conseguimos realizar ensaios que permitissem observar o perfil de ativação dessas células nos animais PSP.

Trabalhos da literatura têm investigado a influência de processos infecciosos no padrão de sono (Toth e Krueger, 1988; Toth e col., 1995). Já foi descrito, em roedores, que modelos experimentais de infecção e inflamação induzem alterações comportamentais que coletivamente são chamadas de "*sickness behavior*". Dentre essas alterações observa-se: aumento de comportamentos semelhantes à ansiedade (Lacosta e col., 1999) e depressão (Yirmiya, 1996; Dunn e col., 2005), alterações na temperatura corporal (Kozak e col., 1994; Blaque e col., 1996), redução da atividade locomotora (Kozak e col., 1994; Swiergiel e Dunn, 2007), da interação social (Cohn e de Sa-Rocha, 2006), e do consumo de água e comida (Swiergiel e col., 1997; Dunn e col., 2006), além do aumento da quantidade de sono de ondas lentas (Lancel e col., 1995; Opp e Toth, 1998; Mullington e col., 2000; Toth e Opp, 2001; Morrow e Opp, 2005).

Também em humanos é comum observarmos letargia e uma forte sonolência durante infecções e condições inflamatórias. Baseando-se nessas premissas decidimos avaliar o efeito da PSP aplicada após a indução do modelo de CLP. Nossos resultados mostraram uma redução na sobrevivência de animais que foram submetidos à PSP chegando a 100% de mortalidade 48 h após a PSP. Esses resultados são semelhantes aos observados por Friese e colaboradores (2009) que mostraram aumento da mortalidade em animais submetidos à 48 h de PSP após o CLP, independente da idade.

O recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, avaliado 24 h após a PSP, está aumentado e não mostrou diferenças em relação aos animais que não tiveram o sono interrompido após o CLP. Assim como observado nos resultados anteriores, a redução na sobrevivência observada nesses animais não está relacionada a uma possível falência na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Apesar desses animais apresentarem aumento sistêmico dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-1 $\beta$ , o que segundo dados da literatura está relacionado

com a inibição da migração em direção ao foco inflamatório, esses aumentos foram semelhantes aos observados nos animais do grupo CTRL<sub>CLP</sub>.

Em nosso trabalho não observamos efeito de 96 h de PSP na resposta relacionada ao recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório de animais submetidos ao modelo da bolha de ar, pleurisia e CLP. Os dados da literatura mostram que a privação de sono, seja total, parcial ou de fases específicas, assim como a restrição, e a fragmentação do sono, em humanos e animais, levam a diversas alterações em parâmetros imunológicos, indicando um possível envolvimento do sono na manutenção da homeostase do sistema imune (Everson 1993; Dingess e col., 1994; Irwin e col., 1994; Ozturk e col., 1999; Everson e Toth 2000; Lange e col., 2003; Everson 2005; Zager e col., 2007; Yehuda e col., 2009; Everson e col., 2008; Zager e col., 2012). Porém, demonstramos neste trabalho que quando esses animais são desafiados por um modelo de inflamação aguda, ou por um modelo induzido por um agente infeccioso, parecem ser capazes de montar uma resposta de maneira semelhante à observada em animais controle.

Zager e colaboradores (2012) mostraram que 72 h de PSP leva a uma redução no número de linfócitos sanguíneos e uma alteração na população dessas células no sangue e no baço, porém sem alterar o padrão de migração de células T helper, células T citotóxicas, células B, células NK, macrófagos e células dendríticas para o foco inflamatório 2 h após o desafio com LPS. Em 2007 o mesmo grupo mostrou que 96 h de PSP elevam os níveis da proteína C3 do sistema complemento (Zager e col., 2007). Podemos sugerir que apesar das alterações em parâmetros imunológicos, característicos das respostas imune inata e adaptativa, descritas na literatura para animais PSP, esses animais não apresentaram alterações na capacidade de montar uma resposta frente a um estímulo inflamatório ou infeccioso.

Além das alterações no perfil imunológico, a PSP induz um quadro de hipernocicepção. Já está bem estabelecido na literatura que períodos de PSP levam a alterações na sensibilidade à dor (Hicks e col., 1978; Onen e col., 2001; Nascimento e col., 2007), e o inverso também ocorre, quadros de dor crônica alteram o padrão de sono (Enomoto e col., 2011). Na tentativa de reverter esse quadro e compreender melhor a relação entre privação de sono e dor, nosso grupo mostrou que a utilização de drogas classicamente prescritas para dor crônica, como os antidepressivos tricíclicos e a morfina não são capazes de reverter a hiperalgesia induzida por 96 h de PSP (Damasceno e col., 2009; Skinner e col., 2011).

O teste da formalina é amplamente utilizado em estudos comportamentais para avaliação de sensibilidade nociceptiva via estimulação química. Os ratos demonstram um padrão de resposta bifásico a este teste, apresentando uma resposta inicial (fase I, 0-5 minutos pós-injeção) semelhante à dor aguda, chamada de fase neurogênica, na qual ocorre a ativação direta dos nociceptores locais pela formalina. E uma resposta tardia (fase II, a partir do 20º minuto pós-injeção), chamada de fase inflamatória, na qual o comportamento observado é resultante da ação de mediadores inflamatórios liberados pelo estímulo, que seria reflexo de um estado de dor mais intenso (Wheeler-Aceto and Cowan, 1991). Este teste pode ser considerado um modelo de dor contínua gerado por lesão tecidual (Meunier e col., 1998).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que animais submetidos à 96 h de PSP apresentam um aumento no número de comportamentos relacionados à dor após administração de formalina 2,5%, quando comparados a animais controles (Damasceno, 2010).

As lipoxinas têm ação anti-inflamatória quando administradas no sítio da inflamação, ou sistemicamente por via intravenosa ou oral (para revisão ver Serhan, 2005). Muitos dos fatores atenuados por essa ação estão envolvidos no processamento da dor, tanto no local da lesão quanto na medula espinal (Svensson e col., 2007).

Em nosso trabalho escolhemos utilizar o teste da formalina como ferramenta para investigar um possível efeito do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-lipoxinas, sobre a hipernocicepção induzida pela PSP. Nossos dados mostraram que o tratamento com ATL-1 reduziu o número de comportamentos relacionados à dor tanto em animais controle quanto em animais PSP. No entanto, merece atenção o fato de que os animais PSP apresentaram uma redução mais pronunciada em relação aos animais controle, que reduziram o número de comportamentos relacionados à dor apenas em um intervalo durante a observação. Tomando-se como base o intervalo de tempo cuja diferença no número de comportamentos relacionados à dor foi estatisticamente significativa entre os grupos Controle e PSP (25-30), observamos que, enquanto nos animais controles a redução entre os que receberam salina ou ATL-1 foi de 42,3%, nos animais PSP esta redução foi muito maior (62,15%) e, além disso, apareceu em outros intervalos observados. Esses resultados indicam que o ATL-1 pode alterar o processamento da dor.

Nossos dados estão de acordo com os encontrados por Svensson e colaboradores (2007). Os autores mostraram que animais injetados intravenosamente com ATL-1, LX<sub>A4</sub> ou LX<sub>B4</sub> e que tiveram uma de suas patas injetadas com carragenina, apresentaram um aumento na latência de retirada da pata quando esta era submetida à estimulação térmica. Os autores realizaram a administração do ATL-1, LX<sub>A4</sub> ou LX<sub>B4</sub> dois minutos antes da injeção intraplantar de carragenina e observaram o aumento na latência 90 minutos após a injeção de carragenina. Tipicamente a injeção intraplantar de carragenina resulta em uma inflamação transiente e aparente com aumento no volume da pata, vermelhidão da pele, e a hiperalgesia iniciando 2 h após a injeção de carragenina e resolvida depois de 24 h (Hua e col., 2005; Menezes-de-Lima e col., 2006). Em nosso modelo, a injeção de formalina inicia imediatamente um quadro de dor aguda causada pela sensibilização direta de nociceptores pela própria formalina, seguido de um quadro de dor inflamatória. Em função do nosso modelo se tratar de animais PSP, que estão sujeitos a pressão de sono, exercida pelo efeito rebote que é observado após períodos de PSP, nós escolhemos utilizar o modelo da formalina, em que o quadro de dor se estabelece quase que imediatamente, para não darmos oportunidade dos animais PSP dormirem. Observamos o efeito do ATL-1 em nossos animais PSP 20 minutos após a injeção de formalina, que se manteve até o final do período de observação.

Outro dado importante foi observado durante as seções experimentais. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo, o que fazia com que os animais (CTRL e PSP) após 25 a 30 minutos do início do teste comesçassem a apresentar sonolência. Porém, o estímulo doloroso induzido pela formalina fazia com que os animais, mesmo deitados, apresentassem comportamentos relacionados à dor, mostrando que mesmo a pressão de sono estando alta, em função da fase clara e da PSP, a sensação dolorosa se sobrepunha a pressão de sono. O tratamento com ATL-1 reduziu fortemente o número de comportamentos relacionados à dor, e apesar do estímulo doloroso induzido pela formalina, a sensação dolorosa não foi capaz de se sobrepor à pressão de sono com tamanha intensidade como observado nos animais que receberam salina. Esses resultados mostram a forte influência do tratamento com ATL-1 na redução da sensação dolorosa experimentada por esses animais.

É importante salientar que a inflamação aguda induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias não apenas no sítio inflamatório, mas também na medula espinal, além de regular positivamente a COX-2 induzindo a liberação de prostanoídes, contribuindo desta forma para a facilitação do processamento da dor (Watkins e Maier, 2003). Esse envolvimento medular revela um papel importante de células não neuronais, como astrócitos e microglia, na regulação da nocicepção. É descrito que astrócitos medulares expressam receptores ALX e que o provável mecanismo de ação das lipoxinas no processamento da dor seja através de suas ações anti-inflamatórias tanto no local da inflamação, quanto na medula através da interação com esses receptores (Svensson e col., 2007).

É possível que os animais PSP, em função das alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como descrito nesta tese, apresentem uma facilitação do processamento da dor, e o tratamento com ATL-1 foi capaz, através de sua ação local e medular, de reduzir a sensibilidade à dor observada nesses animais.

Sendo assim, sugere-se que a hiperalgesia observada no teste químico da formalina após 96 h de PSP possa estar associada a mediadores inflamatórios capazes de alterar a transmissão da dor tanto localmente quando ao nível medular, uma vez que o pré-tratamento com ATL-1 foi capaz de amenizar o número de comportamentos relacionados à dor. No entanto, novos estudos devem ser conduzidos para que se identifiquem os mecanismos pelos quais o ATL-1 foi capaz de reduzir a hiperalgesia química observada em animais PSP.

Os efeitos da privação de sono no sistema imune são amplamente reconhecidos. No entanto, nossos resultados mostraram que do ponto de vista do recrutamento de leucócitos, 96 h de PSP não foram capazes de alterar a resposta inflamatória. Porém, o aumento de mediadores inflamatórios observado nesses animais corrobora a relação entre a privação de sono e o sistema imune descrita na literatura. Além disso, esse aumento pode estar relacionado à hiperalgesia observada em animais PSP, uma vez que o tratamento com ATL-1 reverteu esse efeito, possivelmente através de mecanismos que envolvam sua ação anti-inflamatória.



## 10 CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, nossos dados permitem concluir que:

A resposta inflamatória não foi alterada por 96 h de PSP do ponto de vista do recrutamento de leucócitos, tanto no modelo da bolha de ar, quanto na pleurisia induzidas por carragenina, porém observamos um aumento nos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

A PSP aplicada antes, ou após a indução do CLP reduziu a sobrevivência dos animais chegando a 100% de mortalidade em 72 h e 48 h, respectivamente, sem alterações no padrão de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. No entanto, observamos aumento dos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em animais PSP

O pré-tratamento com ATL-1 reverteu a hiperalgesia induzida por 96 h de PSP na fase inflamatória (fase II) do modelo da formalina.

## REFERÊNCIAS

- Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 2001;487:318–322.
- Albert I, Cicala GA, Siegel J. The behavioral effects of REM sleep deprivation in rats. *Psychophysiology* 1970; 6:550-560.
- Ali H., Haribabu, B., Richardson, R. M., Snyderman, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Med. Clin. North. Am.* 1997; 81:1-28
- Almeida AP, Bayer BM, Horakova Z, Beaven MA. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980; 214: 74-79.
- Alves-filho JC, Benjamim C, Tavares-murta BM, Cunha FQ. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: A critical event for the outcome of this syndrome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2005;100 (Suppl 1): 223–226.
- Alves-filho JC, Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock.* 2008;30(suppl 1):3-9.
- Ammendola G, Di Rosa GM, Sorrentino L. Leucocyte migration and lysosomal enzymes release in rat carrageenin pleurisy. *Agents Actions.* 1975; 5: 250-255.
- Andersen ML, Martins PJ, D'almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res.* 2005; 14: 83–90.
- Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 1953; 118:273-274.
- Ashok K. Singhca, Yin Jiang. Differential activation of NFkB/ RelA-p50 and NFkB/p50-p50 in control and alcohol-drinking rats subjected to carrageenin-induced pleurisy. *Mediators of Inflammation.* 2004; 13(4):255-262.
- Baker TL. Introduction to sleep and disorders. *Med Clin North Am* 1985; 69:1123-52.
- Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 1984; 7:309-338.
- Beishuizen, A.; Vermes, I.; Haanen, C. Endogenous mediators in sepsis and and shock. *Crit. Care Med.* 1999; 27:1369-1377.
- Belenky G, Wesensten NJ, Thorne DR, Thomas ML, Sing HC, Redmond DP, Russo MB, Balkin TJ. Patterns of performance degradation and restoration during sleep restriction and subsequent recovery: a sleep dose-response study. *J Sleep Res.* 2003; 12:1–12.

Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J. Infect. Dis.* 2000;182:214.

Benjamim CF, Hogaboam CM, Kunkel SL. The chronic consequences of severe sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 2004;75:408-412.

Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun.* 2002;70(7):3602-10.

Berger RJ. Tonus of Extrinsic Laryngeal Muscles during Sleep and Dreaming. *Science* 1961; 134:840.

Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Fang VS, Leitch CA, Schoeller DA, Refetoff S, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation. *Sleep.* 1989; 12: 31–41.

Bittencourt LR, Santos-Silva R, Taddei JA, Andersen ML, De Mello MT, Tufik S. Sleep complaints in the adult Brazilian population: a national survey based on screening questions. *J Clin Sleep Med.* 2009;15(5):459-63.

Blanche, R., Meakin, C., Millet, S., Gardner, C.R. Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha. *Gen. Pharmacol.* 1996;27:973-977.

Born J, Lange T, Hansen K, Molle M, Fehm HL. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J Immunol* 1997; 158:4454-64.

Brooks HF, Osabutey CK, Moss RF, Andrews PL, Davies DC. Cecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab Brain Dis.* 2007; 22(3):353-73.

Buela G. Avaliação dos distúrbios de iniciar e manter o sono. In: Reimão R. Sono: aspectos atuais. Rio de Janeiro: Atheneu Editora, 33:1990.

Burgos I, Richter L, Klein T. Increased nocturnal interleukin-6 excretion in patients with primary insomnia: a pilot study. *Brain Behav Immun.* 2006; 20:246–253.

Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 2000; 87: 15.

Carskadon MA, Rechtschaffen A. Monitoring and staging human sleep. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC. Principles and practice of sleep medicine. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 2000.

Casey KL. The imaging of pain: background and rationale. Casey M C Bushnell (Eds) *Pain Imaging* 2000:1-29.

Chiang N, Fierro IM, Gronert K, Serhan C. Activation of lipoxin A4 receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. *J. Exp. Med.* 2000; 191:1197–1208.

Clària J, Serhan CN. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell–leukocyte interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 9475–9479.

Coenen AML, Van Luijtelaar ELJM. Stress induced by three procedures of deprivation of PS, *Physiol. Behav.* 1985. 35:501–504.

Cohen HB, Dement WC. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. *Science* 1965; 150:1318-1319.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002.420(6917):885-891.

Cohn, D.W., De Sa-Rocha, L.C. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. *Physiol. Behav.* 2006; 87, 932-937.

Compasso F, Dunn CJ, Yamamoto S, Willoughby DA, Giroud JP. Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. *J Pathol.* 1975; 116: 117-124.

Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: Pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clinical Science.* 1998;94(5): 461–471.

Cotran, RS; Kumar V; Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease.* WB Saunders: Philadelphia, p.1425, 1999.

Culebras A. Sleep disorders and neuromuscular disease. *Semin Neurol* 2005; 25:33-38.

D'almeida V, Hipólido DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira VBC, Tufik S. Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett.* 1997; 235: 25–28.

Damasceno F, Skinner GO, Cordeiro JF, 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, De Almeida OM. Systemic amitriptyline administration does not prevent the increased thermal response induced by paradoxical sleep deprivation. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009; 94:51-55.

Damasceno, Fabio. *Nocicepção em animais privados de sono paradoxal: Efeito de fármacos antidepressivos e participação do sistema nitrérgico.* 2010. 135f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Dawson, J, Sedgwick, AD, Edwards, JC., Lees, PA comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *Int. J. Tissue React.*, 1991;13:171- 185.

Delves PT, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *Nem Engl. J. Med.* 2000; 343(1):37-49.

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

Dement W. The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1958; 10:291-296.

Dew MA, Hoch CC, Buysse DJ, Monk TH, Begely AE, Houck PR. Healthy older adults' sleep predicts all-cause mortality at 4 to 19 years of follow-up. *Psychosom Med.* 2003. 65:63–73.

Dewas C, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA, El-benna J. TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: Partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocytemacrophage colony-stimulating factor. *Journal of Immunology.* 2003;171(8): 4392–4398.

Di Rosa M. Biological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmacol.*1972; 24: 89-102.

Di Rosa M, Sorrentino L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. *Eur J Pharmacol.* 1968; 4(3):340-2.

Dickstein JB, Moldofsky H, Lue FA, Hay JB. Intracerebroventricular injection of TNF- $\alpha$  promotes sleep and is recovered in cervical lymph. *Am. J. Physiol.* 1999; 276, R1018–R1022.

Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997; 112, 321S–329S.

Dinarello CA. The biology of interleukin-1. *FASEB J.* 1988; 2:108–13.

Dinges DF, Chugh DK. Physiologic correlates of sleep deprivation. In: Kinney JM, Tucker HN, eds. *Physiology, Stress, and Malnutrition: Functional Correlates, Nutritional Intervention.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997:1–27.

Dinges DF, Douglas SD, Zaugg L, Campbell DE, Mcmann JM, Whitehouse WG, Orne EC, Kapoor SC, Icaza E, Orne MT. Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J Clin Invest* 1994; 93: 1930-1939.

Dorrian J, Dinges DF. Sleep deprivation and its effects on cognitive performance. In: Lee-Chiong T, ed. *Encyclopedia of Sleep Medicine*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2005:139–144.

Dray, A. Peripheral Mediators of Pain. In: Dickenson, A., Besson, J., M., editors. *The Pharmacology of Pain*. 1997. Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin, p. 21 -41.

Dunn AJ, Swiergiel AH, De Beaurepaire, R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005; 29:891-909.

Dunn AJ, Swiergiel, AH, Zhang H, Quan N. Reduced ingestion of sweetened milk induced by interleukin-1 and lipopolysaccharide is associated with induction of cyclooxygenase- 2 in brain endothelia. *Neuroimmunomodulation*. 2006; 13, 96-104.

Dunzendorfer S, Schratzberger P, Reinisch N, Kähler CM, Wiedermann CJ. Augmentation of tumor necrosis factor $\alpha$ - induced priming of fMet-Leu-Phe-stimulated neutrophils by pentoxifylline. *Immunology Letters*. 1997;58(2): 75–78.

Durmer JS, Dinges DF. Neurocognitive consequences of sleep deprivation. *Semin Neurol*. 2005;25:117–129.

Enomoto T, Yamashita A, Torigoe K, Horiuchi H, Hirayama S, Nakahara K, Yanase M, Sakai H, Ikegami D, Nagase H, Suzuki T, Iseki M, Inada E, Narita M. Effects of mirtazapine on sleep disturbance under neuropathic pain-like state. *Synapse*. 2011

Everson CA, Smith CB, Sokoloff L. Effects of prolonged sleep deprivation on local rates of cerebral energy metabolism in freely moving rats. *J Neurosci*. 1994; 14: 6769–6778.

Everson CA, Thalacker CD, Hogg N. Phagocyte migration and cellular stress induced in liver, lung, and intestine during sleep loss and sleep recovery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295:R2067–R2074.

Everson CA, Toth LA. Systemic bacterial invasion induced by sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 278:905-916.

Everson CA. Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 289:1054-1063.

Everson CA. Sustained sleep deprivation impairs host defense. *Am J Physiol*. 1993; 265:1148-1154.

Ferraz MM, Fontanella JC, Damasceno F, Silva De Almeida OM, Ferraz MR. Chronic amantadine treatment enhances the sexual behaviour of male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 86:616-621.

Fiore S, Maddox JF, Perez HD, Serhan CN. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J. Exp. Med*. 1994; 180:253–260.

Fiore S, Ryeom SW, Weller PF, Serhan CN. Lipoxin recognition sites. Specific binding of labeled lipoxin A4 with human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:16168–16176.

Fishbein W, Gutwein BM, Paradoxical sleep and memory storage processes, *Behav. Biol.* 1977. 19: 425–464.

Friese RS, Bruns B, Sinton CM. Sleep deprivation after septic insult increases mortality independent of age. *J Trauma.* 2009;66,50-54.

Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi A.G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004; 3:401–416.

Grahnstedt S, Ursin R. Platform sleep deprivation affects deep SWS in addition to REM sleep, *Behav. Brain Res.* 1985; 18:233– 239.

Grigg JM, Savill JS, Sarraf C, Haslett C, Silverman M. Neutrophil apoptosis and clearance from lungs. *Lancet.* 1991; 338: 720-722.

Hamdi A, Brock J, Ross K, Prasad C. Effects of rapid eye movement sleep deprivation on the properties of striatal dopaminergic system. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 46:863-866.

Hechtman DH, Cybulsky MI, Fuchs HJ, Baker JB, Gimbrone JR MA. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *Journal of Immunology.* 1991;147: 883–892.

Hicks RA, Moore JD, Findley P, Hirshfield C, Humphrey V. Rem sleep deprivation and pain thresholds in rats. *Percept Mot Skills.* 1978;47:848-50

Hobson JA, Pace-Schott, EF. The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems consciousness and learning. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3:679-691.

Hobson JA. Neural control of sleep. In: Turek FW, Zee PC. Regulation of sleep and circadian rhythms. New York: Marcel Dekker, Inc., 81-110: 1999.

Hobson JA. Sleep and dreaming. *J Neurosci* 1990; 10:371-382.

Hua XY, Svensson CI, Matsui T, Fitzsimmons B, Yaksh TL, Webb M. Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. *Eur. J. Neurosci.* 2005; 22:2431–2440.

Hussain N, Wu F, Zhu L, Thrall RS, Kresch MJ. Neutrophil apoptosis during the development and resolution of oleic acid induced acute lung injury in rat. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1998; 19: 867-874.

Irwin M, Mascovich A, Gillin JC, Willoughby R, Pike J, Smith TL. Partial sleep deprivation reduces natural killer cell activity in humans. *Psychosom Med* 1994; 56: 493-498.

Irwin MR, Wang M, Campomayor CO, Collado-Hidalgo A, Cole S. Sleep deprivation and activation of morning levels of cellular and genomic markers of inflammation. *Arch Intern Med.* 2006;166:1756–1762.

Irwin MR, Wang M, Hyong Jin Cho DR, Olmstead R, Breen EC, Martinez-Maza O, Cole S. Sleep Loss Activates Cellular Inflammatory Signaling. *Biol. Psychiatry.* 2008.15;64(6):538-40

Iwata M, Suzuki S, Asai Y, Inoue T, Takagi K. Involvement of Nitric Oxide in a Rat Model of Carrageenin-Induced Pleurisy. *Mediators of Inflammation.* 2010; 10: 11 pages

Jouvet D, Vimont P, Delorme F, Jouvet M. Study of selective deprivation of the paradoxal sleep phase in the cat. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1964;158:756-9.

Jouvet M, Michel F, Courjon J. On a stage of rapid cerebral electrical activity in the course of physiological sleep. *C R Seanc Biol* 1959; 153: 1024-8.

Jouvet M. Neurophysiology of the states of sleep. *Physiol Rev* 1967; 47:117-177.

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

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001; 413:203 - 210.

Kales A, Rechtschaffen A, University of California LABIS, Network NNI. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. Allan Rechtschaffen and Anthony Kales, editors. Bethesda, Md.: U. S. National Institute of Neurological Diseases and Blindness, Neurological Information Network, 1968.

Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5:749–59.

Keane MP, Strieter RM. Chemokine signaling in inflammation. *Crit Care Med.* 2000;28:13–26.

Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E. The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev.* 2007; 11:163–178.

Koch T. Origin and mediators involved in sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. *Kidney Int Suppl.* 1998; 53, p.66-69.

Kovalzon VM, Tsibulsky VL. REM-sleep deprivation, stress and emotional behavior in rats, *Behav. Brain Res.* 1984; 14:235– 245.

Kozak W, Conn CA, Kluger MJ, Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice. *Am. J. Physiol.* 1994; 266:125-135.



Krueger JM, Majide JA. Humoral links between sleep and the immune system. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 992:9–20.

Krueger JM, Obal FJ, Fang J, Kubota T, Taishi P. The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Ann NY Acad Sci.* 2001;933:211–221.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Robbins Basic Pathology* (Saunders, 2003).

Kummer CL, Coelho TCRB. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais. *Rev Bras Anesthesiol.* 2002; 5(4).

Kundermann B, Krieg JC, Schreiber W, Lautenbacher S. The effect of sleep deprivation on pain. *Pain Res Manage.* 2004;9(1)25-32.

Lacosta S, Merali Z, Anisman H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogeniclike effects. *Brain Res.* 1999;818, 291-303.

Lancel M, Cronlein J, Muller-Preuss P, Holsboer F. Lipopolysaccharide increases EEG delta activity within non-REM sleep and disrupts sleep continuity in rats. *Am. J. Physiol.* 1995;268, R1310–R1318.

Lange T, Perras B, Fehm HL, Born J. Sleep enhances the human antibody response to hepatitis a vaccination. *Psychosom Med.* 2003; 65: 831-835.

Lavie P. *The enchanted world of sleep.* New Haven: Yale University Press, 1996.

Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, Karin M. IKK $\alpha$  limits macrophage NF- $\kappa$ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature.* 2005 Apr 28;434(7037):1138-43.

Lee K, Spanswick D. Pain. *Seminars in cell & developmental biology* 2006;17:541-3.

Lee TH, Horton CE, Kyan-Aung U, Haskard D, Crea AE, Spur BW. Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine, *Clin. Sci.* 1989; 77, 195–203.

Lesauter J, Silver R. Output signals of the SCN. *Chronobiol Int* 1998;15:535-50.

Levy BD, Fokin VV, Clark JM, Wakelam MJO, Petasis NA, Serhan CN. Polyisoprenyl phosphate (PIPP) signaling regulates phospholipase D activity: a “stop” signaling switch for aspirin-triggered lipoxin A4, *FASEB J.* 1999; 13, 903–911.

Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet.* 1999; 353: 1607-1609.

Lorton D, Lubahn CL, Estus C, Millar BA, Carter JL, Wood CA, Bellinger DL. Bidirectional communication between the brain and the immune system: implications for physiological sleep and disorders with disrupted sleep. *Neuroimmunomodulation.* 2006; 13(5-6):357-74.

Lotsch J, Geisslinger G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin. Pharmacokinet.* 2001; 40: 485 - 499.

Luboshitzky R. Endocrine activity during sleep. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13:13–20.

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

Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein linked lipoxin A4 receptor, *J. Biol. Chem.* 1997; 272:6972–6978.

Maianski NA, Maianski AN, Kuijpers TW, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol* 2004;111:56–66.

Majno G, Joris I. *Cells, Tissues and Disease* (Oxford Univ. Press, 2004).

Marshall L, Born J. Brain-immune interactions in sleep. *Int Rev Neurobiol* 2002; 52: 93–131.

Martin SW, Stevens AJ, Brennan BS, Davies D, Rowland M, Houston JB. The six-day-old rat air pouch model of inflammation: characterization of the inflammatory response to carrageenan. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1994;32(3):139-47.

Martins PJF, Mello MT, Tufik S. Exercício e sono. *Rev Bras Med Esporte.* 2001; 7: 28–36.

McCarley RW, Massaquoi SG. A limit cycle mathematical model of the REM sleep oscillator system. *Am J Physiol* 1986; 251:R1011-1029.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008. 454:428-435.

Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Regan MM, Price NJ, Dinges DF, Mullington JM. Effect of Sleep Loss on C-Reactive Protein, an Inflammatory Marker of Cardiovascular Risk. *Journal of the American College of Cardiology.* 2004; 43(4):678-683.

Mendelson WB, Guthrie RD, Frederick G, Wyatt RJ. The flower pot technique of rapid eye movement (REM) sleep deprivation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1974; 2:553–556.

Menezes-De-Lima O Jr., Kassuya CA, Nascimento AF, Henriques MG, Calixto JB. Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006; 80:123–135.

Mense S. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. *Am J Med.* 1983; 75:4-14.

Merskey H. Classification of Chronic pain: Descriptions of chronic pain Syndromes and definitions of pain terms. IASP Press Seattle 1994:p. 210.

Meunier CJ, Burton J, Cumps J, Verbeeck RK. Evaluation of the formalin test to assess the analgesic activity of diflunisal in the rat. *Eur J Pharm Sci.*; 6(4): 311-6. 1998

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 1999; 57: 1 - 164.

Miro E, Cano-Lozano MC, Buela-Casal G. Electrodermal activity during total sleep deprivation and its relationship with other activation and performance measures. *J Sleep Res* 2002;11:105-12.

Moldofsky H, Lue FA, Eisen J, Keystone E, Gorczynski RM. The relationship of interleukin-1 and immune functions to sleep in humans. *Psychosom Med.* 1986; 48(5):309-18.

Moldofsky H. Central nervous system and peripheral immune functions and the sleep-wake system. *J Psychiatr Neurosci.*1994;19(5):368-74.

Morrow JD, Opp MR. Diurnal variation of lipopolysaccharide- induced alterations in sleep and body temperature of interleukin-6-deficient mice. *Brain Behav. Immun.* 2005; 19, 40-51.

Mullington J, Korth C, Hermann DM, Orth A, Galanos C, Holsboer F, Pollmacher T. Dose-dependent effects of endotoxin on human sleep. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000; 278, 947-955.

Murai N, Nagai K, Fujisawa H, Hatanaka K, Kawamura M, Harada Y. Concurrent evolution and resolution in an acute inflammatory model of rat carrageenin-induced pleurisy. *J. Leuko. Biol.* 2003; 73:456-463.

Nascimento DC, Andersen ML, Hipolide DC, Nobrega JN, Tufik S. Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain mu-opioid receptors. *Behav Brain Res* 2007;178:216-20.

National Sleep Foundation. Adult sleep habits. Sleep in America Poll. Washington, DC: National Sleep Foundation; 2002

National Sleep Foundation. One-Third of Americans Lose Sleep Over Economy. Washington, DC: National Sleep Foundation; 2009.

National Sleep Foundation. Teens and sleep. Sleep in America Poll. Washington, DC: National Sleep Foundation; 2006.

Netea MG, Van Der Meer JWM, Van Deuren M, Kullberg BJ. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol.* 2003; 24, 254-258.

NHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute). National Sleep Disorders Research Plan, 2003. Bethesda, MD: National Institutes of Health.

Nunes JR, Tufik S, Validation of the modified multiple platform method (MMP) of paradoxical sleep deprivation in rats, *Sleep Res.* 1994; 23: 419.  
of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005; 29, 891-909.

Okudaira M, Schwarz J. *Histoplasma capsulatum* infection in rat air pouch. *Arch Pathol.* 1962 Sep;74:239-43.

Onen SH, Alloui A, Jourdan D, Eschaliere A, Dubray C. Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on pain sensitivity in the rat. *Brain Res* 2001; 900:261-267.

Opp MR, Krueger JM. Anti-interleukin-1 $\beta$  reduces sleep and sleep rebound after sleep deprivation in rats. *Am J Physiol.* 1994;266:R688–95.

Opp MR, Postlethwaite AE, Seyer JM, Krueger JM. Interleukin 1 receptor antagonist blocks somnogenic and pyrogenic responses to an interleukin 1 fragment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992; 89, 3726–3730.

Opp MR, Toth LA. Somnogenic and pyrogenic effects of interleukin-1 $\beta$  and lipopolysaccharide in intact and vagotomized rats. *Life Sci.* 1998; 62, 923-936.

Otsuka Y, Nagano K, Nagano K, Hori K, Oh-Ishi J, Hayashi H, Watanabe N, Niitsu Y. Inhibition of neutrophil migration by tumor necrosis factor. Ex vivo and in vivo studies in comparison with in vitro effect. *Journal of Immunology.* 1990;145: 2639–2643.

Ozturk L, Pelin Z, Karadeniz D, Kaynak H, Cakar L, Gozukirmizi E. Effects of 48 hours sleep deprivation on human immune profile. *Sleep Res Online* 1999; 2: 107-111.

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(Supl I):S33-8.

Papayianni A, Serhan CN, Brady HR. Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. *J Immunol.* 1996;156:2264-2272

Parada CA, Yeh JJ, Reichling DB, Levine JD. Transient attenuation of protein kinase C $\epsilon$  can terminate a chronic hyperalgesia state in the rat. *Neuroscience.* 2003; 120: 219 - 226.

Parkinson JF Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2006; 5: 91–106.

Parmeggiani PL, Rabini C. Phases of sleep and environmental temperature. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1967; 25:214-6.

Patel SR, Malhotra A, Gottlieb DJ, White DP, Hu FB. Correlates of long sleep duration. *Sleep* 2006;29(7):881–9.

Patel SR. Social and demographic factors related to sleep duration. *Sleep* 2007;30(9):1077–8.

Penido C, Costa KA, Futuro DO, Paiva SR, Kaplan MA, Figueiredo MR, Henriques MG. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006; 104: 225–233.

Petersen-Zeitl KR, Basbaum AI. Second messengers, the substantia gelatinosa and injury-induced persistent pain. *Pain*. 1999; 6: 5 - 12.

Pinto Júnior LR. Polissonografia normal e nos principais distúrbios do sono. In: Tufik S. *Sono: aspectos clínicos*. São Paulo, Instituto do Sono- Unifesp, 2000:1-26).

Pires MLN, Benedito-Silva AA, Mello MT, Del Giglio S, Pompéia C, Tufik S. Sleep habits and complaints of adults in the city of S.o Paulo, Brazil, in 1987 and 1995. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 1505–1515.

Pleuvry BJ, Lauretti GR. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol. Ther.* 1996; 71: 313 - 324.

Puneet P, Mochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:L3–L15

Rangel-Fausto MS, Pittet D, Costigan M. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. *The Journal of the American Medical Association*. 1995; 273:117-123.

Rechtschaffen A, Kales A. A manual of standardized terminology, techniques, and scoring system for sleep stages of human subjects. Washington: U.S. Government Printing office, 1968.

Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA. Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings 1989. *Sleep*. 2002; 25(1):68-87.

Rechtschaffen A, Gilliland MA, Bergmann BM, Winter JB. Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science* 1983;221:182-4.

Rechtschaffen A, Siegel, J. Sleep and dreaming. In: McGraw-Hill, editor. Principles of Neural Science, 4th ed ed. New York: Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M; 2000.

Reddy RC, Standiford TJ. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. *Curr. Opin. Hematol.* 2010;17:18-24.

Redwine L, Irwin M, Hauger RL, Gillin JC. Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6 growth hormone cortisol and melatonin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3597–603.

ReinosO-Suarez F, De Andres I, Rodrigo-Angulo ML, Garzon M. Brain structures and mechanisms involved in the generation of REM sleep. *Sleep Med Rev.* 2001;5:63-77.

Riley NA, Ward C, Sawatzky DA, Sheldrake TA, Dransfield I, Haslett C, ROSSI, AG. Granulocyte apoptosis and macrophage clearance of apoptotic cells as targets for pharmacological intervention in inflammatory diseases. *Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents Medicinal Chem.* 2006; 5:3-12.

Romano M, Serhan CN. Lipoxin generation by permeabilized human platelets. *Biochemistry.* 1992;31:8269–8277.

Russel JA. Management of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355:1699-1713.

Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology.* 1996; 118: 811-819.

Santos R, Carlini EA. Serotonin receptor activation in rats previously deprived of REM sleep. *Pharmacol Biochem Behav* 1983; 18:501-507.

Sawatzky DA, Willoughby DA, Colville-Nash PR, Rossi AG. The Involvement of the Apoptosis-Modulating Proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the Resolution of Acute Inflammation in Vivo. *Am J Pathol.* 2006;168(1):33-41.

Schiffelholz T, Lancel M. Sleep changes induced by lipopolysaccharide in the rat are influenced by age. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001;280,R398–R403.

Schmid-Schonbein GW. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering.* 2006; v. 8, p. 93 – 151.

Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady HR, Colgan SP, Madara JL. Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils, *Biochemistry.* 1995; 34, 14609–14615.

Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol.* 2005; 6, 1191–1197.

Serhan CN. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins*. 1997;53:107-137.

Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and pro resolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25, 101–137.

Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2005; 73:141–162.

Shanley TP, Warner RL, Ward PA. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. *Mol Med Today*. 1995 Apr;1(1):40-5.

Shearer WT, Reuben JM, Mullington JM, Price NJ, Lee BN, Smith EO, Szuba MP, Van Dongen HP, Dinges DF. Soluble TNF-alpha receptor 1 and IL-6 plasma levels in humans subjected to the sleep deprivation model of spaceflight. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:165-170.

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

Shoham S, Ahokas RA, Blatteis CM, Krueger JM. Effects of muramyl dipeptide on sleep, body temperature and plasma copper after intracerebral ventricular administration. *Brain Res*. 1987;419, 223–228.

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 Jul;99(1):94-9.

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

Spath-Schwalbe E, Hansen K, Schmidt F, Schrezenmeier H, Marshall L, Burger K. Acute effects of recombinant human interleukin-6 on endocrine and central nervous sleep functions in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1573–9.

Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet*.1999; 354:1435–1439.

Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E. Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med*. 2004; 141:846–886.

Stamatakis KA, Kaplan GA, Roberts RE. Short sleep duration across income, education, and race/ethnic groups: population prevalence and growing disparities during 34 years of follow-up. *Ann Epidemiol* 2007;17(12):948–55.

Stein C, Schäfer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nature Med.* 2003; 9: 1003 - 1008.

Stickgold R, Walker MP. Sleep-dependent memory consolidation and reconsolidation. *Sleep Med.* 2007; 8: 331–343.

Stickgold R. Sleep-dependent memory consolidation. *Nature* 2005; 437:1272-1278.

Suchecki D, Lobo LL, Hipolide DC, Tufik S. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res.* 1998; 7:276-281.

Suchecki D, Palma BD, Tufik S, Sleep rebound in animals deprived of PS by modified multiple platform method, *Brain Res.* 2000; 875:14–22.

Svensson CI, Zattoni M, Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin inhibit inflammatory pain processing. *J Exp Med.* 2007;204:245-252.

Swiergiel AH, Dunn AJ. Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plusmaze and open field tests. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2007; 86, 651-659.

Swiergiel AH, Smagin GN, Johnson LJ, Dunn AJ. The role of cytokines in the behavioral responses to endotoxin and influenza virus infection in mice: effects of acute and chronic administration of the interleukin-1-receptor antagonist (IL-1ra). *Brain Res.* 1997; 776, 96-104.

Takahashi S, Kapas L, Fang J, Krueger JM. Somnogenic relationships between tumor necrosis factor and interleukin-1. *Am J Physiol* 1999; 276(4 Pt 2): R1132–40.

Takano T, Fiore S, Maddox JF, Brady HR, Petasis NA, Serhan CN. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for antiinflammatory receptors. *J. Exp. Med.* 1997; 185:1693–1704.

Tavares-Murta BM, Cunha FQ, Ferreira SH. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. *British Journal of Pharmacology.* 1998;124: 1369–1374.

Tavares-Murta BM, Zapparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CH, Murta EF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5):1056-61.

Tjølsen A, Hole K. 1997. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., M., editors. *The Pharmacology of Pain.* Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. 1 - 20.

Torres-Duenãs D, Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: effects of



the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. *Shock*. 2006; 25(3): 267-276.

Toth LA, Krueger JM. Alteration of sleep in rabbits by *Staphylococcus aureus* infection. *Infect. Immun.* 1988;56, 1785–1791

Toth LA, Rehg JE, Webster RG. Strain differences in sleep and other pathophysiological sequelae of influenza virus infection in naive and immunized mice. *J. Neuroimmunol.* 1995; 58,89-99.

Toth LA. Microbial modulation of sleep. In: Lydic R, editor. *Handbook of behavioral state control: cellular and molecular mechanisms*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1999. p. 641-57.

Toth LA. Immune-modulatory drugs alter *Candida albicans*-induced sleep patterns in rabbits. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995; 51, 877–884

Toth LA. GARDINER, T. W. & KRUEGER, J. M. Modulation of sleep by cortisone in normal and bacterially infected rabbits. *Am. J. Physiol.* 1992; 263, R1339–R1346.

Toth LA, Opp MR. Cytokine- and microbially induced sleep responses of interleukin-10 deficient mice. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001; 280, 1806-1814.

Tufik S, Andersen ML, Bittencourt LR, Mello MT. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *An Acad Bras Cienc* 2009;81:521-38.

Tufik S. Changes of response to dopaminergic drugs in rats submitted to REM-sleep deprivation. *Psychopharmacology (Berl)* 1981; 72:257-260.

Unruh M, Kurella Tamura M, Larive B, Rastogi A, James S, Schiller B, Gassman J, Chan C, Lockridge R, Klinger A. Impact of sleep quality on cardiovascular outcomes in hemodialysis patients: results from the frequent hemodialysis network study. *Am J Nephrol.* 2011; 33(5):398-406.

Utsunomiya I, Nagai S, Oh-Ishi S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. *J Immunol* 1991; 147:1803–18.

Utsunomiya I, Ito M, Oh-Ishi S. Generation of inflammatory cytokines production in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo. *Cytokine* 1998;10:956–63.

Van Cauter E, Holmback U, Knutson K, Leproult R, Miller A, Nedeltcheva A, Pannain S, Penev P, Tasali E, Spiegel K. Impact of sleep and sleep loss on neuroendocrine and metabolic function. *Horm Res.* 2007;67 suppl1:2–9.

Van Cauter E, Polonsky KS, Scheen AJ. Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocrinology Reviews.* 1997;18:716–738.

Van Dongen HP, Baynard MD, Maislin G, Dinges DF. Systematic interindividual differences in neu-robehavioral impairment from sleep loss: evidence of trait-like differential vulnerability. *Sleep*. 2004;27:423–433.

Van Dongen HP, Maislin G, Mullington JM, Dinges DF. The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation. *Sleep*. 2003;26:117–126.

Van Hulzen ZJ, Coenen AM. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. *Physiol Behav*. 1981;27(4):741-4.

Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Lotsikas A, Zachman K, Kales A, Prolo P, Wong ML, Licinio J, Gold PW, Hermida RC, Mastorakos G, Chrousos GP. Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:2603–2607.

Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, Lin HM, Follett H, Kales A, Chrousos GP. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2119–2126.

Vgontzas AN, Zoumakis M, Papanicolaou DA, Bixler EO, Prolo P, Vela-Bueno A, Kales A. Chronic insomnia is associated with a shift of interleukin-6 and tumour necrosis factor secretion from nighttime to daytime. *Metabolism* 2002;51(7):887–92.

Vincent JL, Abraham E. The last 100 years of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173: 256-263.

Vinegar H, Truax JF, Selph JI. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1973; 143: 711-714.

Volpato S, Guralnik JM, Ferrucci L, Balfour J, Chaves P, Fried LP. Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women: The women's health and aging study. *Circulation*. 2001; 103:947–953.

Walker MP, Stickgold R. Sleep, memory, and plasticity. *Annu Rev Psychol* 2006;57:139-66.

Watkins LR, Maier SF. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat. Rev., Drug Discov*. 2003; 2(12):973– 985.

Wehr TA. A brain-warming function for REM sleep. *Neurosci Biobehav Rev* 1992; 16:379-397.

Wenzel RP. Treating sepsis. *N Engl J Med*. 2002; 347(13):966-967.

Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacol*; 1991;104(1): 35-44.

Williams TJ. Vascular changes in inflammation and mechanisms of oedema formation. In: Textbook of immunopharmacology. Dale MM e Foreman JC, eds. Blackwell Scientific Publications, 1989. 196-204.

Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of the Pain System that modulate pain. J. Clin. Neurophysiol. 1997; 14:2-31

Wong MM, Fish EM. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. Seminars in Immunology. 2003; 15, p. 5-14.

Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science. 2000; 288: 1765 - 1769.

Yehuda S, Sredni B, Carasso RL, Kenigsbuch-Sredni D. REM Sleep Deprivation in Rats Results in Inflammation and IL-17 Elevation. J Interferon Cytokine Res. 2009;29(7):393-398.

Yirmiya R, Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. Brain Res. 1996; 711, 163-174.

Zager A, Andersen ML, Ruiz FS, Antunes IB, Tufik S. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007; 293: R504–R509.

Zager A, Ruiz FS, Tufik S, Andersen ML. Immune Outcomes of Paradoxical Sleep Deprivation on Cellular Distribution in Naive and Lipopolysaccharide-Stimulated Mice. Neuroimmunomodulation. 2012; 19:79–87

Zanetti G, Heumann D, Gérain J, Kohler J, Abbet P, Barras C, Lucas R, Glauser MP, Baumgartner JD. Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. J Immunol. 1992; 148, 1890-1897.