



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

Fernanda Rito-Costa

Efeitos imediatos e tardios da privação de sono em camundongos pré-púberes: implicações em comportamentos tipo-afetivos

Rio de Janeiro

2023

Fernanda Rito-Costa

**Efeitos imediatos e tardios da privação de sono em camundongos pré-púberes:
implicações em comportamentos tipo-afetivos**

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Rio de Janeiro

2023

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

R611 Rito-Costa, Fernanda.

Efeitos imediatos e tardios da privação de sono em camundongos pré-púberes: implicações em comportamentos tipo-afetivos / Fernanda Rito-Costa. - 2023.
73 f.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Privação do sono – Complicações – Teses. 2. Ansiedade na adolescência – Teses. 3. Estresse psicológico – Complicações – Teses. I. Filgueiras, Cláudio Carneiro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.8-009.836

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Fernanda Rito-Costa

**Efeitos imediatos e tardios da privação de sono em camundongos pré-púberes:
implicações em comportamentos tipo-afetivos**

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

Aprovada em 28 de julho de 2023.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____

Dr. André Luiz Nunes Freitas
Universidade Estácio de Sá

Prof.^a Dra. Ana Carolina Dutra Tavares
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho
Faculdade de Formação de Professores

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Dedico a todo aquele que se interessar a leitura deste texto. Faça bom proveito e, com uma leitura crítica, aprimore os conhecimentos que aqui foram destacados. Esta é uma dedicatória à Ciência em si, essa senhora subestimada, mas sempre resgatada durante as crises da humanidade.

Dedico ao meu futuro. A bem verdade é que todo este trabalho foi idealizado para a realização de um futuro. A Fernanda-advir sempre esteve ali a apoiar-me, e eu precisava estar presente e entregá-la uma dissertação.

Por fim e mais importante, dedico esta dissertação ao meu irmão, Vinícius. Assim como eu, ele tem dúvidas sobre suas próprias capacidades. Esta é uma prova de que nós, pessoas ordinárias (e sensíveis), somos capazes de concluir projetos e produzir coisas extraordinárias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Cláudio Filgueiras, por ter me aceitado como aluna neste projeto e pelas conversas sobre privação de sono e os diversos outros fatores de vulnerabilidade do sistema nervoso. Seu conhecimento sobre neurodesenvolvimento é impressionante e sempre transmitido com leveza. Para mim, isso é um exemplo claro de que temos bons cientistas no nosso país.

Agradeço ao Dr. André Freitas, por ter me ensinado, na prática, como atuar em um laboratório, sobretudo em de Neurociências. Lembrar do mestrado é pensar que, como qualquer trabalho, é preciso dedicação e alegria para viver o dia-a-dia. Lembrarei sempre dessa fase com alegria.

À mestra Caroline dos Santos. Desenvolver esse projeto de privação de sono REM não teria sido possível sem sua colaboração. Muito obrigada pela parceria.

Agradeço à toda equipe de pesquisadores do Laboratório de Neurofisiologia da UERJ – professores, pós-doutorandos, técnicos, pós-graduandos e graduandos. Obrigada pelo espaço, acolhimento, suporte e alegria de poder conviver e compartilhar um espaço de trabalho. Vocês fizeram eu me sentir à vontade para perguntar, trabalhar e discutir Ciência, e essa foi uma das oportunidades mais lindas que aconteceu na minha vida.

Agradeço à minha família – meus pais, meu irmão e minha cunhada –, pelo suporte, carinho e paciência em lidar comigo durante esse período da minha formação. Na vida, não fazemos nada sozinhos, e parte desse projeto é mérito de vocês. Obrigada por me apoiarem em todos os âmbitos, e entenderem a importância da formação acadêmica para minha vida e que, por isso, eu precisaria dedicar tanto tempo e energia.

Essa ideia me tomou: o exército é o corpo: eu sou o cérebro. Pensar é a minha luta.

Virginia Woolf

RESUMO

RITO-COSTA, Fernanda. **Efeitos imediatos e tardios da privação de sono em camundongos pré-púberes**: implicações em comportamentos tipo-afetivos. 2023. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A redução do número de horas de sono em crianças e adolescentes em idade escolar está associada com uma série de distúrbios comportamentais, como transtornos de ansiedade, depressão e baixo desempenho escolar. Estudos realizados em animais sugerem que a privação de sono durante o desenvolvimento interfere em uma série de processos que influenciam na formação e a maturação da circuitaria neural, como a sinaptogênese, o refinamento sináptico, a mielinização e a síntese proteica. Desta forma, é razoável supor que a privação de sono durante a infância ou período pré-púbere (período marcado por intensa sinaptogênese em diversas regiões cerebrais) pode acarretar em prejuízos neurocomportamentais por um longo período da vida do indivíduo. Contudo, até o momento, existem poucos estudos investigando as consequências comportamentais da privação em roedores jovens. O objetivo geral deste trabalho foi testar a hipótese de que a privação de sono durante o período pré-púbere afeta o comportamento tipo-ansioso e a capacidade de lidar com o estresse. Em P23 (P1 = dia do nascimento), camundongos suíços de ambos os sexos foram privados de sono por 72h (grupo REMd) pelo método das múltiplas plataformas ou aos procedimentos de controle (grupo CONT) ou permaneceram em suas gaiolas de criação (grupo NAÏVE). O comportamento tipo-ansioso e a capacidade de lidar com o estresse foram avaliados, respectivamente, no labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste de nado forçado (TNF). Os testes foram realizados imediatamente após a privação de sono, em P26, e 10 dias após a privação, em P36. No LCE, o percentual de entradas nos braços abertos dos animais dos grupos CONT e REMd foi maior do que o do grupo NAÏVE, em P26. Contudo, em P36, sob o mesmo teste, não foram observadas diferenças entre os grupos. No TNF, não foram observadas diferenças entre os grupos NAÏVE, CONT e REMd nos animais testados em P26. Contudo, em P36, os animais do grupo REMd apresentaram uma atividade natatória significativamente maior do que os animais dos grupos CONT e NAÏVE, que não diferiram entre si. Os resultados no LCE sugerem que, em curto prazo, tanto a privação de sono como os procedimentos de controle podem diminuir os níveis de ansiedade, mas estes efeitos são transitórios. No TNF, a privação de sono não afetou a atividade natatória em curto prazo, mas 10 dias após promoveu uma marcante hiperatividade, que é sugestiva de uma incapacidade de lidar com a situação estressante do teste. Com base em nossos resultados podemos concluir que a privação de sono durante o período pré-púbere é capaz de afetar, em curto prazo, o comportamento tipo-ansioso e, em longo prazo, a capacidade de lidar com o estresse.

Palavras-chave: Insônia; Privação de sono; Desenvolvimento; Comportamento rotacional; Comportamento tipo-ansioso.

ABSTRACT

RITO-COSTA, Fernanda. *Short and long-term effects of sleep deprivation in prepubertal mice: implications on anxiety-like and coping with stress behaviors*. 2023. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Sleep deprivation in children and adolescents of school age is associated with a series of behavioral disorders, such as anxiety disorders, depression and poor school performance. Animal studies suggest that sleep deprivation during development interferes with a series of processes that influence the formation and maturation of neural circuitry, such as synaptogenesis, synaptic refinement, myelination and protein synthesis. Thus, it is reasonable to assume that sleep deprivation during childhood or the prepubertal period (a period marked by intense synaptogenesis in several brain regions) can lead to neurobehavioral impairments for a long period. However, there are few studies investigating the behavioral consequences of deprivation in rodents. The objective of this study was to test the hypothesis that sleep deprivation during the prepubertal period affects anxiety-like behavior and the ability to cope with stress. From P23 (P1 = day of birth) to P26, Swiss mice of both sexes were sleep-deprived (REMd group) by the multiple platforms method or submitted to control procedures (CONT group) or remained in their rearing cages (NAÏVE group). The anxiety-like behavior and the coping with stress were assessed, respectively, in the elevated plus maze (EPM) and in the forced swim test (FST). Mice were tested immediately after sleep deprivation at P26 or 10 days after sleep deprivation, at P36. In EPM, the percentage of entries into the open arms of CONT and REMd groups was greater than that NAÏVE group, at P26. However, in P36, differences were not observed between groups. In FST, no differences were observed between the NAÏVE, CONT and REMd groups in the animals tested at P26. However, at P36, the REMd group showed a greater swimming activity than the CONT and NAÏVE groups, which did not differ from each other. The EPM results suggest that, in the short term, both sleep deprivation and control procedures can transiently decrease anxiety levels. In FST, sleep deprivation did not affect swimming activity in the short term, but 10 days later, it promoted a marked hyperactivity, which is suggestive of an inability to deal with the stressful situation of the test. Based on these results, we can conclude that sleep deprivation during the prepubertal period is able to affect, in the short term, anxiety-like behavior and, in the long term, the ability to deal with stress.

Keywords: Insomnia; Sleep deprivation; Development; Rotational behavior; Anxiety-like behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Tipos de ondas cerebrais obtidas por eletroencefalograma	13
Figura 2 – Registros eletroencefalográficos e hipnograma representativos de um episódio de sono	15
Tabela 1 – Tempo total de sono e quantidade de sono recomendada nos primeiros 5 anos..	16
Figura 3 – Tipos de atividades cerebrais durante o sono de humanos, ratos e camundongos.....	21
Figura 4 – Modelo adaptado do método de plataforma múltipla.....	29
Figura 5 – Modelo esquemático do labirinto em cruz elevado	31
Figura 6 – Modelo esquemático do teste do nado forçado.....	33
Tabela 2 – Número de óbitos e taxa de mortalidade após o período de privação de sono.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Massa corporal dos animais antes e após a indução de privação de sono.....	37
Gráfico 2 – Massa corporal dos grupos antes e após a indução de privação de sono.....	38
Gráfico 3 – Massa corporal dos grupos em P36.....	39
Gráfico 4 – Atividade deambulatória nos braços fechados, em P26.....	40
Gráfico 5 – Atividade deambulatória em braços abertos, em P26.....	41
Gráfico 6 – Tempo de permanência nos braços abertos, em P26.....	42
Gráfico 7 – Atividade deambulatória nos braços fechados, em P36.....	43
Gráfico 8 – Entrada em braços abertos, em P36.....	44
Gráfico 9 – Atividade natatória dos animais ao longo do tempo, em P26.....	45
Gráfico 10 – Atividade natatória, em função da privação de sono, em P26.....	46
Gráfico 11 – Atividade natatória dos animais ao longo do tempo, em P36.....	47
Gráfico 12 – Atividade natatória, em função da privação de sono, em P36.....	48

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	OBJETIVOS	27
1.1	Objetivo geral	27
1.2	Objetivos específicos	27
2	MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1	Modelo animal e desenho experimental	28
2.2	O modelo de privação de sono REM	29
2.3	Testes comportamentais	30
2.3.1	<u>Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)</u>	30
2.3.2	<u>Teste adaptado de nado forçado</u>	32
2.4	Análises estatísticas	34
3	RESULTADOS	36
3.1	Taxa de mortalidade	36
3.2	Análise de massa corporal	37
3.3	Teste comportamental do labirinto em cruz elevado	40
3.3.1	<u>Animais testados imediatamente após a indução da privação de sono</u>	40
3.3.2	<u>Animais testados 10 dias após a indução da privação de sono</u>	43
3.4	Teste comportamental do nado forçado	45
3.4.1	<u>Animais testados imediatamente após a indução da privação de sono</u>	45
3.4.2	<u>Animais testados 10 dias após a indução da privação de sono</u>	47
4	DISCUSSÃO	49
4.1	Considerações metodológicas sobre o modelo de privação de sono	49
4.2	Ganho de massa corporal durante o período de privação de sono	50
4.3	Comportamento no labirinto em cruz elevado: atividade nos braços abertos	52
4.4	Comportamento no labirinto em cruz elevado: atividade nos braços fechados	54
4.5	Queda de atividade ao longo do teste de nado forçado	55
4.6	Aumento da atividade natatória nos animais privados de sono	56
	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59

INTRODUÇÃO

Aspectos históricos

Dormir e sonhar sempre foram parte integrante da existência humana e poucas condições fisiológicas receberam tanta atenção de poetas, escritores e da comunidade acadêmica como o sono. Até meados do século XX, prevalecia ideia do sono como um processo passivo que, ao contrário da vigília, era desencadeado pela diminuição da estimulação sensorial (DEMENT, 2005; THORPHY, 2011).

Um bom exemplo é o texto inicial do livro “A filosofia do sono” de Robert Macnish, membro da escola de médicos e cirurgiões de Glasgow, publicado em 1834: “*O sono é o estado intermediário entre a vigília e a morte; a vigília é considerada como o estado ativo de todas as funções animais e intelectuais e a morte como sua suspensão total*” (MACNISH, 1834, citado por Dement, 2005).

Vale mencionar que durante o século XIX, considerado a era das teorias do sono, uma série de suposições menos populares foi proposta para explicar o início do sono (THORPHY, 2011). As teorias vasculares congestiva e anêmica propunham que o sono era gerado, respectivamente, pelo aumento ou pela redução da quantidade de sangue na cavidade craniana e as várias versões de uma teoria química (humoral) na qual produtos de fadiga como as “hipnotoxinas”, as “urotoxinas” ou o dióxido de carbono se acumulavam durante o dia, causando o sono e eram eliminadas gradualmente durante o sono, levando o indivíduo a acordar (THORPHY, 2011). Além disso, nenhuma distinção clara se fazia entre o sono e outros estados inativos, como o coma, o estupor, a anestesia e a hibernação (DEMENT, 2005; SCHULZ, 2022).

A descoberta e o aprimoramento do eletroencefalograma (EEG) na década de 1920 permitiu um grande avanço na investigação da atividade neural durante o sono (WALKER, 2008; THORPHY, 2011). Em 1929, Johannes Berger (1873–1941) foi o primeiro a registrar a atividade elétrica no cérebro humano, demonstrando marcantes diferenças entre a atividade na vigília e no sono (WALKER, 2008; THORPHY, 2011).

Na década de 1930, uma série de estudos demonstrava que o padrão de registro eletroencefalográfico do sono apresentava uma identidade própria caracterizada por ondas lentas (baixa frequência) de alta amplitude, enquanto a vigília se caracterizava por ondas de baixa amplitude e o ritmo alfa de alta frequência (DEMENT, 2005; SCHULZ, 2022; WALKER, 2008; THORPHY, 2011). Estes estudos contribuíram para que a imagem de um cérebro

desligado durante o sono desse lugar a de um cérebro ativo, ainda que envolvido em uma atividade neuronal lenta, sincronizada e ociosa durante essa fase (WALKER, 2008; THORPHY, 2011, DEMENT, 2005; SCHULZ, 2022).

Em 1953, Eugene Aserinsky e Nathaniel Kleitman, demonstraram a ocorrência de movimentos oculares rápidos e aleatórios durante o estágio do sono em que ocorriam os sonhos, que eles chamaram de “sono de movimento rápido dos olhos” (REM, do inglês *rapid eyes movement*)” (ASERINSKY, 1953). Em 1957, Kleitman e William Dement descobriram um padrão recorrente de sono REM e não-REM durante o monitoramento eletroencefalográfico noturno, uma descoberta que deixou claro que o sono não poderia mais ser considerado um estado homogêneo (DEMENT, 2005).

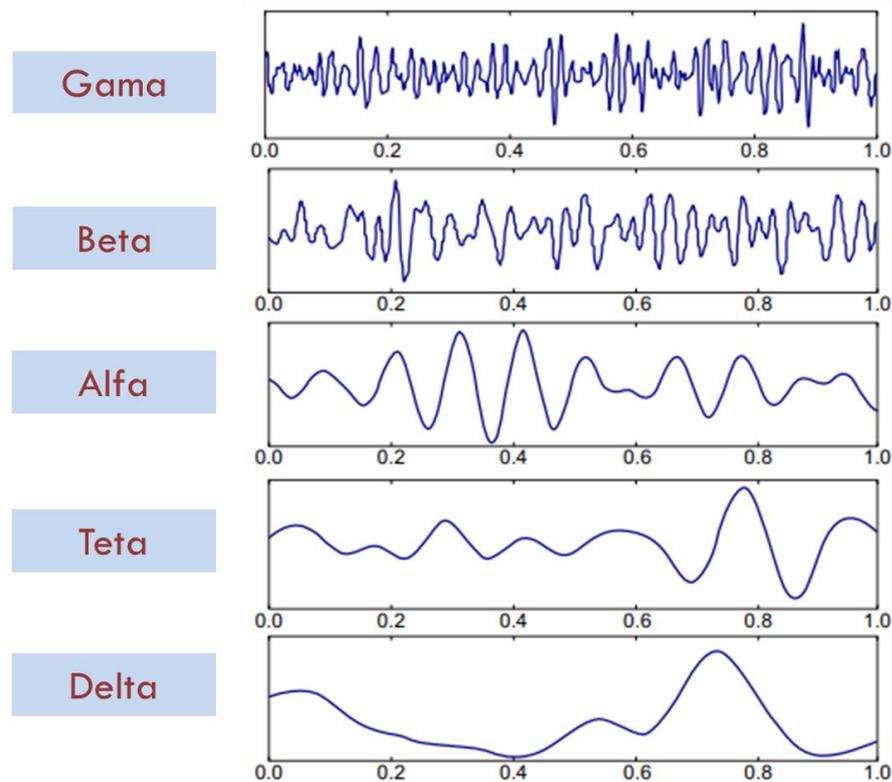
Durante a década de 1960, muitos pesquisadores participaram de uma descrição detalhada e quantitativa do sono humano e animal, incluindo mudanças relacionadas a diferentes estágios de desenvolvimento. Contudo, o maior avanço talvez tenha sido o conceito da dualidade do sono, ou seja, de que o sono consiste em dois estados orgânicos totalmente diferentes: o sono REM e o sono não-REM (WALKER, 2008; THORPHY, 2011, DEMENT, 2005; SCHULZ, 2022).

Estágios do sono

À medida que o sono avança, a atividade eletroencefalográfica sofre mudanças marcantes que são acompanhadas por alterações comportamentais e fisiológicas. Essas mudanças seguem um padrão e são usualmente agrupadas em duas fases: o sono não-REM e o sono REM. Estas fases são distribuídas em 5 estágios, 4 estágios de sono não-REM e 1 estágio de sono REM.

Conforme representado na Figura 1, antes de começarmos a dormir, o padrão de atividade beta, de ondas dessincronizadas de baixa amplitude e alta frequência (16-30Hz), característico da vigília, muda progressivamente para um padrão alfa, de menor frequência (8-12Hz). A frequência das ondas eletroencefalográficas continua caindo progressivamente até que o indivíduo entra no estágio 1, de ondas dessincronizadas de baixa amplitude e alta frequência, mesclando ondas alfa e ondas teta, com frequência de 4 a 8Hz.

Figura 1 – Tipos de ondas cerebrais obtidas por eletroencefalograma



Nota: A figura representa esquematicamente as cinco ondas cerebrais típicas encontradas nos estados de vigília, sono não-REM e sono REM. São elas (1) Gama, presente em resolução de problemas, estados de concentração; (2) Beta, indivíduo ocupado, mente ativa; (3) Alfa, em estado reflexivo, descansado; (4) Teta, durante sonolência; e (5) Delta, durante o sono e sonhos.

Fonte: Adaptado ABHANG, 2016.

O estágio 1, também chamado N1, é um estágio de transição do qual podemos ser facilmente despertados. No estágio 2 ou N2, que dura em torno de 10 a 25 minutos, as ondas teta são entremeadas por oscilações ocasionais de 10 a 15 Hz, denominadas de fusos do sono, e por ondas lentas de alta amplitude, os complexos K (FERNANDEZ, 2020; IOANNIDES, 2019).

A presença dos fusos e dos complexos K marca de modo inequívoco o início do sono (IOANNIDES, 2019). Os fusos têm sido associados com a consolidação de memórias e fenômenos de plasticidade sináptica (FERNANDEZ, 2020), enquanto os complexos K funcionariam como marcadores do ruído de fundo, que protegem o indivíduo de acordar, e associados com a plasticidade sináptica (IOANNIDES, 2019; LECHAT, 2021).

No estágio 3, o número de fusos diminui e a amplitude das ondas eletroencefalográficas de baixa frequência aumenta de modo marcante. Este estágio dura cerca de 10 minutos com o ritmo delta (frequência de 2 a 4 Hz), presente em cerca de 20 a 50% do tempo (WALKER,

2008). Na medida em que o estágio 3 avança, ocorre uma diminuição progressiva do tônus muscular e das frequências cardíaca e respiratória.

O estágio 4 dura de 20 a 40 minutos e é o estágio de sono mais profundo, com ritmos delta de 0,5 a 2 Hz, ocupando mais de 50% do tempo (WALKER, 2008). Dada a presença das ondas delta nos estágios 3 e 4, esses períodos são denominados, em conjunto, como o período de sono de ondas lentas (SWS, do inglês *slow wave sleep*). De modo interessante, o percentual de ritmo delta durante o sono de ondas lentas tem sido utilizado como um marcador clássico de um processo regulatório denominado homeostase do sono (DIJK, 2010). A homeostase do sono é referida como um processo dependente do uso, ou seja, quanto maior a ativação de determinadas redes neurais durante o período de vigília, maior será a proporção de ritmo delta dessas redes durante o sono subsequente (DIJK, 2010).

A redução experimental do SWS (sem alterar o tempo total de sono ou a duração do REM) pela administração de estímulos auditivos (> 110dB) assim que as ondas lentas aparecem no EEG, leva a um aumento na propensão ao sono diurno e marcantes reduções de desempenho cognitivo (DIJK, 2010). Dessa forma, a proporção de ritmo delta durante o SWS parece exercer um importante papel em processos de recuperação que ocorrem durante o sono.

Após o estágio 4, o padrão eletroencefalográfico retorna para o estágio 3, segue para o estágio 2, e subitamente entra em um breve período de 10 minutos de sono REM, caracterizado por ritmos beta e gama do EEG (PEEVER, 2017). Em função das ondas beta e gama serem comumente observadas durante a vigília, esse estágio também é denominado de sono paradoxal.

Durante o sono REM é possível ver, com clareza, os movimentos rápidos dos olhos por debaixo das pálpebras e 90% das pessoas que são acordadas durante esse período relatam estar sonhando (ASERINSKY, 1953). Neste período, o consumo de oxigênio encefálico é mais elevado do que quando estamos realizando certas atividades da vigília, como a realização de operações matemáticas complexas (BEAR, 2015).

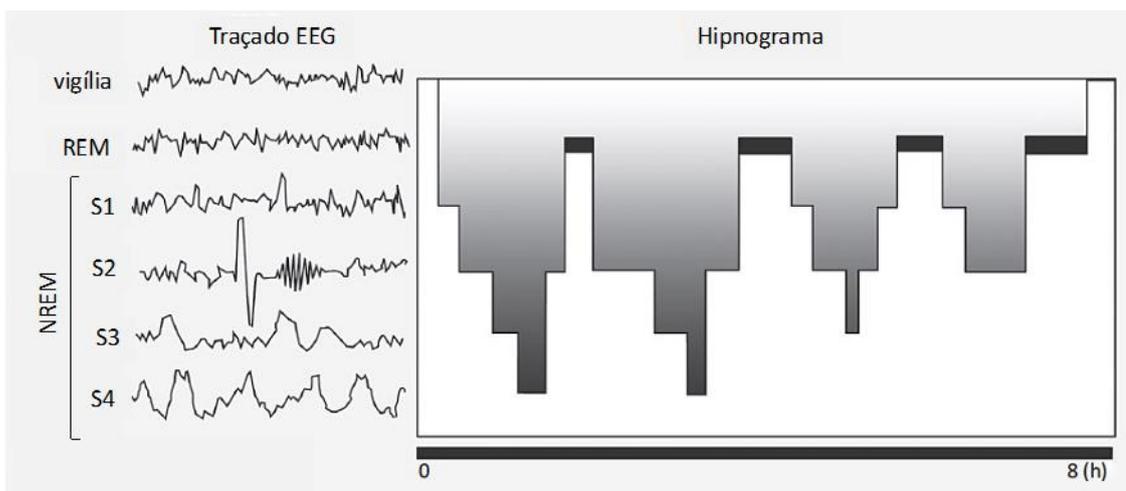
O sono REM é, portanto, caracterizado por uma profunda atonia, com perda quase total da capacidade de realização de movimentos em quase todo o corpo. As exceções são o diafragma, que continua a funcionar de modo tênue, e a musculatura dos olhos e do ouvido interno, que funcionam normalmente. De modo geral, a atividade simpática aumenta durante o sono REM e ocorre aumento das frequências cardíaca e respiratória, que se tornam irregulares. Contudo, a temperatura interna cai de modo marcante durante essa fase (BEAR, 2015).

Uma série de estudos vem mostrando que o sono REM é importante para a formação de memórias, em especial de memórias espaciais e emocionais (PEEVER, 2017). Além disso, a formação das memórias relacionadas às conexões entre o hipocampo e o córtex podem envolver

duas etapas, a transmissão da informação, que ocorre durante o sono não-REM, e a consolidação das memórias que ocorre no sono REM (AVILA, 2023). Outras funções do sono REM são a facilitação da plasticidade cortical, a restauração da transmissão aminérgica e o manutenção da criatividade (PEEVER, 2017).

Durante uma noite típica de 8h de sono, um adulto passa por algo entre 4 e 5 ciclos discretos de sono não-REM e REM. O primeiro ciclo geralmente vai da entrada no estágio 1 até o final do primeiro estágio de sono REM e dura em média de 90 a 110 minutos (BEAR, 2015). Na medida em que os ciclos se repetem, ocorre uma redução geral na duração do sono não-REM, particularmente dos estágios 3 e 4, e um aumento dos períodos de sono REM (Figura 2). Assim, na primeira metade da noite existe um predomínio de sono não-REM e na segunda metade predomina o sono REM.

Figura 2 – Registros eletroencefalográficos e hipnograma representativos de um episódio de sono



Nota: Traços eletroencefalográficos na vigília e em cada estágio do sono, acompanhados por um hipnograma representativo, com uma distribuição típica dos cinco estágios de um episódio de sono noturno de 8 horas. No início da noite, os primeiros ciclos não-REM e REM são dominados pelo sono não-REM, enquanto os ciclos posteriores contêm mais sono REM.

Fonte: GENZEL, 2013.

O sono durante o desenvolvimento

Do nascimento até a idade adulta, o padrão de sono e vigília passa por profundas mudanças. O sono dos recém-nascidos é polifásico, com intervalos randômicos de 20 a 50 minutos que, somados, ocupam cerca de 80% do dia (AHMAD, 2021). Os recém-nascidos entram diretamente no sono ativo, um predecessor do sono REM, que ocupa 50% do tempo total de sono no início da vida. Aos dois meses de idade, os fusos de sono característicos do estágio 2 podem ser identificados no EEG e os sonsos REM e não-REM podem ser claramente diferenciados (AHMAD, 2021).

Ritmos regulares de sono-vigília desenvolvem-se por volta dos 2 a 4 meses de idade e marcam a transição do sono neonatal para o sono infantil (AHMAD, 2021). Dos 3 aos 6 meses se consolida um período de sono noturno principal e uma série de períodos de sono mais curtos (cochilos) durante o dia (AHMAD, 2021). Os complexos K se formam por volta dos 5 a 6 meses de idade, permitindo que o sono seja agora classificado com maior certeza nos estágios N1, N2, N3 e REM (AHMAD, 2021).

Durante a infância, o número de cochilos durante o dia vai diminuindo progressivamente. No primeiro ano, as crianças dormem entre 12 e 16 horas durante as 24h do dia, incluindo de 1 a 2 sonecas por dia (AGOSTINI, 2021; BATHORY, 2017). Para a maioria das crianças ocidentais, a soneca diurna é perdida entre as idades de 3 e 5 anos (AGOSTINI, 2021; BATHORY, 2017; THORPE, 2015). Alguns autores sugerem que o cochilo após os 2 anos de idade está associado ao início tardio do sono noturno ou à redução da qualidade e duração do sono (THORPE, 2015). Com a perda desses cochilos, a duração total do sono diminui, uma vez que a duração do sono noturno permanece estável (Tabela 1).

Tabela 1 – Tempo total de sono e quantidade de sono recomendada nos primeiros 5 anos

Idade	Média de sono/dia (variação)	Quantidade recomendada de sono/dia
0-3 meses	14h (12-16)	14-17 h
3-6 meses	13h (12-15)	12-15 h
6-12 meses	13h (10-14)	12-15 h
1-2 anos	12-13h (12-14)	11-14h
3-5 anos	12-13h (12-14)	10-13 h

Fonte: Adaptado BATHORY, 2017.

Os ciclos de sono REM e não-REM a partir da infância vão se tornando mais longos e com cada vez menos sono REM e mais sono não-REM (BATHORY, 2017; RANA, 2019). Bebês prematuros passam 80% de seu tempo de sono em REM; recém-nascidos, 50% e, ao final do primeiro ano de vida, a porcentagem de sono REM chega a 30% do tempo total de sono (RANA, 2019). Alguns autores sugerem que essa grande proporção de sono REM estimula o desenvolvimento estrutural de cérebro, a diferenciação neural e o estabelecimento das vias neurais durante os períodos perinatal e neonatal, no qual há uma quantidade relativamente baixa de estímulos externos (AGOSTINI, 2021; BATHORY, 2017).

Dos 5 aos 19 anos, a porcentagem de sono REM permanece relativamente estável, enquanto a porcentagem de sono não-REM N1 e N2 (estágios 1 e 2) aumentam, e ocorre uma diminuição concomitante de N3 e N4 (estágios 3 e 4) (RANA, 2019). Ainda que algumas variações possam existir, ao final do desenvolvimento, as proporções relativas de cada estágio do sono são de 2 a 5% para N1 (estágio 1), de 40 a 55% para N2 (estágio 2), de 13 a 25% para N3 (estágios 3 e 4) e de 20 a 25% para o REM (RANA, 2019).

De modo semelhante ao que ocorre nos primeiros anos de vida, a duração do tempo total de sono continua a diminuir durante os anos escolares e a adolescência. Contudo, uma série de evidências vem mostrando que a necessidade de dormir não muda nesta faixa de idade (CARSKADON, 1998; CROWLEY, 2018). Este fenômeno tem sido associado a mudanças nos mecanismos que imprimem o ritmo circadiano, o que pode tornar progressivamente difícil para os adolescentes adormecer cedo quando chega a noite e promover um atraso progressivo no horário de início do sono (CARSKADON, 1998; CROWLEY, 2018).

Em acordo com esta ideia, a Síndrome do Atraso das Fases do Sono (*Delayed Sleep-Phase Syndrome*), que se caracteriza pela dificuldade de adormecer no horário apropriado, pelo início de sono tardio, por dificuldade em acordar pela manhã (para as atividades escolares ou de trabalho regulares) e pela sonolência diurna é particularmente comum em crianças e adolescentes (FUTENMA, 2023).

Além disso, o avanço tecnológico, a luz artificial e, mais recentemente, o desenvolvimento das mídias sociais, que competem com o tempo de sono, também têm contribuído para este fenômeno (AGOSTINI, 2021; AHMAD, 2021). Desta forma, nos últimos anos, um número cada vez maior de jovens em idade escolar é privado de sono (AGOSTINI, 2021; AHMAD, 2021; CROWLEY, 2018; FUTENMA, 2023).

Estudos recentes mostram que distúrbios do sono são relatados em 10% a 25% das crianças com desenvolvimento típico e em 40% a 100% das crianças com distúrbios do

neurodesenvolvimento, como o Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) e as Desordens do Espectro Autista (DEA) (AHMAD, 2021; BELLI, 2022).

A desregulação do sono em crianças e adolescentes está associada a uma série de problemas neurocomportamentais, como agressividade, depressão, falta de atenção, hiperatividade, impulsividade, além de outros transtornos de humor (AGOSTINI, 2021). Meninas entre 12 e 18 anos que dormem menos que 7,5 horas por noite durante o período escolar tem maior risco de depressão e ansiedade (OJIO, 2016). Um estudo realizado em escolas americanas com 3.120 estudantes no período escolar, equivalente ao ensino médio brasileiro, mostrou que os estudantes com notas C, D ou F relataram dormir, em média, 25 minutos a menos à noite e ir para a cama 40 minutos mais tarde do que aqueles que receberam notas A ou B (WOLFSON, 1998).

Quando comparados a adolescentes que dormem mais de 8 horas por noite, aqueles que dormem menos de 6 horas têm aproximadamente duas vezes mais chances de apresentar comportamentos de risco – se envolver em direção arriscada, uso de maconha, álcool e tabaco, ter comportamento sexual de risco e comportamentos agressivos (WEAVER, 2018). Além disso, aqueles que dormiram menos de 6 horas aumentaram em três vezes a probabilidade de relatar que estão pensando em suicídio e em mais de quatro vezes a probabilidade de relatar uma tentativa de suicídio que resultou em tratamento (WEAVER, 2018).

Tomados em conjunto, estes dados sugerem um forte conflito entre os horários de início da maioria das atividades escolares e as necessidades fisiológicas de sono dos estudantes. Estudantes privados de sono realizam as atividades acadêmicas de aprendizagem que demandam concentração e uma plena capacidade cognitiva em um momento em que seu corpo deveria estar dormindo (MELTZER, 2006). Além disso, o aumento do número de demandas impostas aos estudantes (p. ex. deveres de casa, esportes, atividades e trabalho) muitas vezes atrasa ainda mais a hora de dormir, aumenta o débito de sono e os níveis de estresse. Por essas razões, um número crescente de autores sugere uma alteração dos horários escolares e uma limitação ao uso das tecnologias de rede à noite (AGOSTINI, 2021; FUTENMA, 2023; SCHLIEBER, 2021).

Vale mencionar que a maioria dos estudos que avaliam as consequências neurocomportamentais da redução das horas de sono em crianças e adolescentes avaliam os transtornos durante o período de privação, enquanto estes ainda estão na escola. Considerando a importância do sono durante a infância e adolescência, é possível que os transtornos decorrentes da privação de sono persistam após a saída da escola ou o reestabelecimento do sono. Contudo, esta é uma questão ainda pouco estudada.

O sono em outras espécies

Fundamentalmente, o sono pode ser caracterizado pelas alterações eletrofisiológicas e comportamentais associadas a estados semelhantes ao sono (ANAFI, 2019; KEENE, 2018). No primeiro caso, o sono é caracterizado por mudanças na atividade das ondas cerebrais, conforme medido pelo EEG, nos humanos, ou registros de potencial de campo local, em invertebrados (KEENE, 2018). No entanto, para várias espécies existe uma série de limitações para a realização de registros eletrofisiológicos, incluindo dificuldade de registro em pequenos animais e impraticabilidade de registro em um ambiente natural. Nestes casos, o sono é definido apenas pela observação do comportamento (KEENE, 2018; YAMAZAKI, 2020).

A caracterização comportamental do sono pode envolver pelo menos cinco critérios, a saber: (1) quiescência comportamental prolongada; (2) ser reversível após estimulação (para diferenciar da hibernação, do torpor ou do coma); (3) identificação de uma postura estereotipada ou específica da espécie; (4) aumento do limiar para despertar, em resposta a estímulos externos; e (5) aumento compensatório do comportamento (rebote) após privação de sono (ANAFI, 2019; KEENE, 2018; YAMAZAKI, 2020).

De uma perspectiva filogenética, o sono ou estados semelhantes ao sono já foram descritos de modo consistente em várias espécies animais de seis filos: *Cnidária*, *Platyhelminthes*, *Mollusca*, *Nematoda*, *Arthropoda* e *Chordata* (ANAFI, 2019). A conservação evolutiva do sono, apesar dos custos aparentes da vulnerabilidade à predação e da ausência de forrageamento ou de reprodução, sugere que o sono cumpre um propósito comum que beneficia sobrevivência animal (ANAFI, 2019; MIYAZAKI, 2017; YAMAZAKI, 2020).

Ainda que não se possa descartar completamente a hipótese de que o sono seja o resultado de uma evolução convergente, na qual o sono teria surgido repetida e independentemente durante a evolução, a maior parte das evidências sugere que o sono emergiu precocemente em um ancestral comum (ANAFI, 2019). A hipótese de evolução a partir de um ancestral comum se baseia no fato de que espécies evolutivamente distantes compartilham uma maquinaria bioquímica regulatória e as mesmas funções do sono, que incluem importantes papéis no desenvolvimento, metabolismo e consolidação de memórias (ANAFI, 2019). Os sonos REM e não-REM, que são observados consistentemente em mamíferos e aves, também podem estar presentes em répteis, sugerindo que, entre os vertebrados, o sono estava presente desde quando os amniotas evoluíram, há mais de 300 milhões de anos (ANAFI, 2019).

A arquitetura do sono varia muito entre as espécies e tal variabilidade tem sido associada a características anatômicas, fisiológicas e ecológicas (KEENE, 2018; YAMAZAKI, 2020).

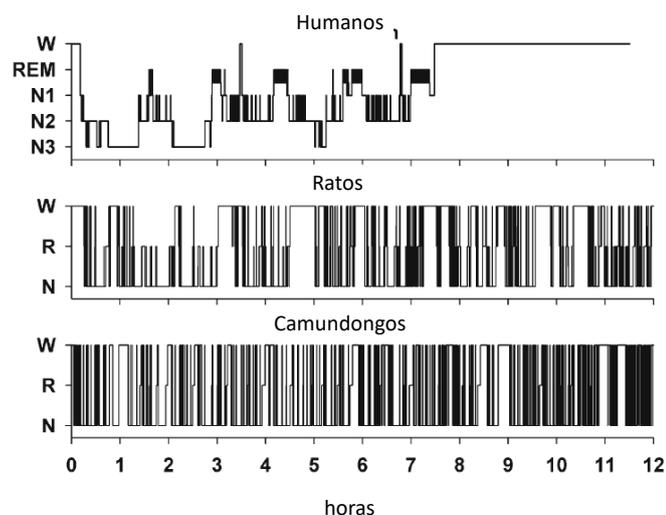
Existe uma grande variação na duração e no tempo do sono, com animais como o elefante africano, dormindo apenas 3 a 4 horas por dia (KEENE, 2018), enquanto muitos animais passam a maior parte do tempo dormindo, como os morcegos, que dormem 20 horas por dia (ANAFI, 2019). Mesmo entre os seres humanos, os tempos de sono variam amplamente, variando de menos de 5h a 10h ou mais (KEENE, 2018).

Alguns mamíferos marinhos e aves migratórias possuem atividade semelhante ao sono não-REM em um dos hemisférios cerebrais, enquanto no outro hemisfério mantém a vigília, o que permite a estes animais nadar ou voar enquanto dormem (ANAFI, 2019; YAMAZAKI, 2020). Outro aspecto intrigante do sono dos cetáceos é sua quantidade de sono REM muito baixa (MIYAZAKI, 2017). Considerando que o sono REM em mamíferos é acompanhado por uma perda de tônus muscular, isso poderia ser perigoso para baleias e golfinhos; assim, supõe-se que houve uma adaptação evolutiva para minimizar ou mesmo abandonar a fase REM (MIYAZAKI, 2017).

Os roedores apresentam uma grande variedade de padrões de sono e vigília. Algumas espécies são mais ativas durante o dia, como os esquilos, outras são mais ativas no período noturno, como os ratos e camundongos, e outras ainda não possuem um período preferencial de atividade, como os hamsters e gerbis (YASENKOV, 2012). Ao contrário dos humanos, os roedores apresentam um forte componente ultradiano em seu sono. Mesmo em espécies com clara preferência por atividade em fase clara ou escura, o sono apresenta um forte componente polifásico (Figura 3) e, portanto, nem mesmo em período ativo o animal possui uma vigília consolidada, ou mesmo durante o sono não é observado um repouso de grande duração (YASENKOV, 2012).

Apesar dessas diferenças, a teoria homeostática do sono, que prevê que períodos prolongados de vigília são seguidos de períodos com maiores quantidades de sono não-REM (YAMAZAKI, 2020), parece se aplicar tão bem ao sono polifásico dos roedores quanto ao sono monofásico dos humanos (YASENKOV, 2012). No entanto, devido à natureza polifásica do sono, os roedores podem ser mais flexíveis em sua resposta às influências ambientais (YASENKOV, 2012). Camundongos e ratos, agudamente transferidos de um ciclo claro/escuro de 12h/12h para uma escuridão constante, não mostram grandes mudanças em seu tempo total de sono ao longo de 24 horas (YASENKOV, 2012).

Figura 3 – Tipos de atividades cerebrais durante o sono de humanos, ratos e camundongos



Legenda: W = vigília, REM = período de sono REM, N = sono não-REM nos roedores, N1 = estágio 1, N2 = estágio 2 e N3 = estágios 3 e 4, nos humanos.

Nota: Comparação da arquitetura normal do sono durante o período de menor atividade de humanos, ratos e camundongos. As luzes foram apagadas às 0h para o humano e o sono foi registrado durante 8h. Os roedores foram mantidos em um regime de 12h/12h claro/escuro, com as luzes acesas representadas às 0h, e o sono registrado até as 12h. A arquitetura foi determinada a partir de registros de eletroencefalografia.

Fonte: YASENKOV, 2012.

Os métodos utilizados para medir a atividade eletrofisiológica durante o sono em roedores de laboratório diferem dos utilizados em humanos. Eletrodos colocados no couro cabeludo humano avaliam a atividade de redes corticais bem maiores do que a dos eletrodos implantados diretamente no tecido encefálico dos roedores (LO, 2004; MACHADO, 2004; WEIERGRABER, 2005). Além disso, esta técnica é invasiva, a implantação cirúrgica dos eletrodos para registro do EEG em roedores é demorada, muitas vezes cara de implementar e geralmente inadequada para estudos que envolvem a triagem de muitos animais (FISHER, 2012).

Em vista dessas dificuldades, muitos laboratórios têm utilizado a observação comportamental do sono por meio de gravações de vídeo. De modo geral, períodos de inatividade contínua superiores a 40 segundos são altamente correlacionados (coeficientes de Pearson superiores a 92%) com períodos de sono medido por eletroencefalografia e eletromiografia (EMG) em camundongos (FISHER, 2012; PACK, 2007).

Modelos de privação de sono em roedores

Uma vez que a perda e/ou a fragmentação do sono são uma característica de vários distúrbios do sono e outras condições patológicas em humanos, diversas técnicas foram desenvolvidas para mimetizar o fenômeno em animais de laboratório. Dadas as diferenças marcantes entre o sono REM e não-REM, a maioria dos grupos de pesquisa tem desenvolvido métodos que permitem a privação seletiva de cada estado de sono e não a privação completa (COLAVITO, 2013).

Em humanos, o processo é realizado com o auxílio de monitoramento poligráfico, permitindo a privação seletiva do sono no estágio REM ou do sono em estágios não-REM profundo (em geral, estágios 3-4). A privação limitada ao sono não-REM superficial é impossível de ser realizada na prática, pois o sujeito teria que ser acordado imediatamente ao adormecer, o que equivaleria à privação total. Embora o monitoramento poligráfico também tenha sido usado em roedores, a queda repentina no tônus muscular no início do sono REM possibilita a implementação de uma privação seletiva do sono REM do roedor na ausência de registros eletrofisiológicos (COLAVITO, 2013).

Métodos para a privação total de sono

Experimentalmente, um método viável de privação total de sono em roedores é o procedimento de “manipulação suave”, que se baseia na simples interação direta do experimentador, que mantém ativamente o animal acordado, sendo um método bastante popular. Este procedimento visa minimizar os efeitos do estresse e da restrição locomotora, comumente presentes em outros métodos.

Os animais, geralmente mantidos em suas gaiolas durante o procedimento, são presencialmente monitorados por experimentadores dedicados e treinados, com ou sem o apoio de registros EEG e EMG, e com os quais os animais devem estar familiarizados antes dos experimentos, a fim de evitar uma maior variabilidade dos efeitos. A tarefa do experimentador é estimular os animais apenas o suficiente para mantê-los acordados, sempre que forem observadas sonolência ou tentativas de se engajar em uma postura de dormir, e/ou registros EEG/EMG de baixas frequências aparecerem.

Dois grandes categorias de estimulação podem ser distinguidas: exposição passiva a estímulos externos, e o engajamento em comportamento exploratório e locomotor. No caso de

exposição passiva a estímulos externos, o animal pode ser submetido a ruídos suaves, batidas ou sacudidas suaves da gaiola, ou por contato direto com o animal por meio de uma escova macia ou manual. Um certo grau de estresse induzido deve sempre ser levado em consideração, pois este método está frequentemente associado a níveis elevados de corticosterona (LONGORDO, 2009). A escolha do protocolo, a intensidade e frequência das estimulações são diretamente proporcionais ao tempo de privação de sono desejado (COLAVITO, 2013).

Ratos e camundongos são facilmente mantidos acordados por estimulação leve nas primeiras horas, mas o manuseio direto torna-se necessário após 5 a 6 horas de privação (COLAVITO, 2013). Adaptar a quantidade de estimulação à vigilância constante de cada animal inevitavelmente introduz variabilidade entre diferentes animais, mas, por outro lado, presumivelmente minimiza o estresse.

A privação total de sono também pode ser por administração forçada de padrões específicos de atividade locomotora, continuamente ou assim que o animal apresentar sinais comportamentais e/ou eletrofisiológicos de sono iminente. Vários dispositivos automatizados foram concebidos para tornar o sono impossível em roedores. Esteiras em movimento contínuo ou rodas giratórias são aparelhos comumente usados com essa finalidade em animais experimentais (BORBELY, 1979; PIÉRARD, 2007).

Métodos automatizados também são possíveis, como a “plataforma alternada”, que consiste em um aparelho constituído por duas pequenas plataformas, colocadas num tanque com água, que contínua e alternadamente emergem e submergem na água, obrigando o animal a movimentar-se permanentemente para evitar o contato com a água. Ou ainda, o método da “grade sobre a água”, que consiste em colocar um rato em um piso de grade suspenso sobre um tanque cheio de água, reduzindo significativamente o tempo total de sono, e aumentando a latência do sono e o tempo total de vigília (SHINOMIYA, 2003).

A vantagem óbvia de tais procedimentos é que a qualidade e a quantidade de estimulação podem ser padronizadas para todos os animais experimentais. Por outro lado, reside a preocupação de que os efeitos medidos após o procedimento possam ser consequência de estresse e fadiga, e não da perda de sono *per se*.

Privação seletiva do sono REM

Uma grande parte dos modelos utilizados para privação seletiva de sono REM em animais segue uma técnica básica introduzida por Jouvet em 1964, utilizada para estudar o sono

em gatos (JOUVET, 1964) e que um ano mais tarde foi adaptada para ratos (COHEN, 1965). Essa técnica se utiliza da atonia muscular, que ocorre durante essa fase do sono, fazendo com que o procedimento não necessite de instrumentação complexa, e sendo, portanto, um método simples, que tem sido amplamente utilizado em estudos de privação de sono REM.

Nesse tipo de técnica, o animal adulto é colocado em cima de uma plataforma cercada por água. Em suas primeiras utilizações era comum o uso de um vaso de flores virado como plataforma, cuja superfície era ligeiramente superior à superfície da água (COLAVITO, 2013). Dessa forma, o animal permanecia sobre a superfície da plataforma durante o tempo estipulado para a privação. Tipicamente no início de cada período REM, a perda do tônus muscular faz com que o pescoço relaxe e o focinho toque a água, despertando o animal. À medida que a duração do período de privação aumenta, o animal perde cada vez mais o equilíbrio e cai na água. O controle típico para esta técnica é representado por um animal colocado em um ambiente semelhante – isto é, um aparato com água –, mas em uma plataforma suficientemente grande para permitir uma postura totalmente relaxada e, portanto, o sono REM (MACHADO, 2004; COLAVITO, 2013).

Tal modelo de privação pode ser afetado por uma série de fatores que podem, potencialmente, interferir com os resultados, incluindo estresse associado ao isolamento, restrição de movimento, umidade e fadiga muscular (MACHADO, 2004; REVEL, 2009). Além disso, também pode ocorrer uma perda significativa do sono não-REM (MACHADO, 2004), tornando o modelo menos seletivo.

Para minimizar tais fatores, variações deste modelo foram desenvolvidas. Uma modificação no protocolo foi o uso de várias plataformas em um recipiente maior, privando assim o sono REM de vários animais ao mesmo tempo (MACHADO, 2004; COLAVITO, 2013). Dessa forma, os animais ficam livres para se movimentar pelo aparato, deslocando-se entre plataformas, e mantendo a interação entre os animais, o que reduziria o estresse causado pela imobilidade e pelo isolamento social (SUCHECKI, 2000). A partir disso, foi demonstrado que animais criados em grupo e privados de sono juntos de seus pares em um aparato semelhante, exibem índices de estresse atenuados em comparação com animais privados de sono em um grupo socialmente instável (SUCHECKI, 2000).

Outra modificação consistiu em expor os controles ao mesmo aparelho, exceto pela existência de uma tela de arame colocada sobre as plataformas, a fim de evitar qualquer contato com a água. À tal adaptação à técnica – isto é, com tela de arame no grupo controle e uso de grupos socialmente estáveis –, foi chamada método de plataforma múltipla modificada (MACHADO, 2004).

De modo importante, o registro eletroencefalográfico realizado em ratos adultos submetidos à privação de sono, por 96 horas, pelo método de plataformas múltiplas, revelou que neste paradigma ocorre uma redução de praticamente 100% do sono REM e de 35% do sono não-REM (MACHADO, 2004).

Consequências da privação de sono durante o desenvolvimento de roedores

Ratos e camundongos estão entre as espécies mais utilizadas para avaliar as consequências da privação de sono, especialmente durante o desenvolvimento (MILMAN, 2022). Isto porque os roedores permitem uma manipulação precisa do sono durante janelas específicas de desenvolvimento. Embora alguns aspectos do sono desses animais sejam diferentes dos humanos, uma organização do ciclo de vigília, sono quieto (precursor do sono não-REM) e sono ativo (precursor do sono REM) é claramente aparente em filhotes de ratos com 9 dias de idade, enquanto a atividade delta aparece no dia 11º pós-natal e a atividade teta no 13º dia (SEELKE, 2008). Durante esse período, o sono tem sido associado com a maturação dos sistemas sensorial e motor, e dos circuitos córtico-hipocampais (MILMAN, 2022).

A duração dos períodos de sono aumenta do 2º para 21º dia pós-natal (BLUMBERG, 2005). A avaliação seriada do EEG do sono e da vigília ao longo da segunda semana de vida pós-natal em camundongos revela maior consistência da atividade espectral do EEG, menos transições no estado comportamental e um declínio no tempo gasto no sono REM (MILMAN, 2022).

Entre o 23º e o 29º dias, camundongos do tipo selvagem (WT) passam menos tempo em sono não-REM e REM na fase escura, e a potência teta no REM diminui constantemente (MEDINA, 2022). Ao longo deste período, o cérebro continua a amadurecer, e o sono REM serve para promover esta maturação e plasticidade no desenvolvimento posterior (MILMAN, 2022).

Fisiologicamente, a perda de sono em geral leva a uma resposta homeostática, que pode ser representada como um aumento no tempo total do sono, ou na continuidade do sono não-REM/REM, ou ainda, no aumento da potência das ondas delta do sono não-REM (MIYAMOTO, 2003). Em ratos, 3 horas de privação de sono, do 12º ao 20º dia pós-natal, geram um aumento compensatório do tempo total de sono e na sua continuidade, embora a potência das ondas delta só aumente a partir 24º dia de vida (RIBEIRO, 1999). A quantidade de rebote do sono REM após a privação também aumenta com 2 a 4 semanas de idade (CAO, 2020).

Estudos realizados em roedores demonstram que a privação de sono durante o desenvolvimento interfere com uma série de processos que influenciam na formação e a maturação da circuitaria neural, como a sinaptogênese, o refinamento sináptico, a mielinização e a síntese proteica (SARE, 2016; CONKLIN, 2018; SCHWARZ, 2018). Em camundongos com três semanas de idade, por exemplo, a privação do sono REM por 8 horas leva a uma menor formação de novas espinhas dendríticas do que a não-privação ou mesmo a privação de sono não-REM (WEISMAN, 2011).

Em camundongos adolescentes, a técnica de manipulação suave reduziu o número de células que expressam receptores serotoninérgicos 5-HT1A no córtex cingulado anterior e no córtex infralímbico (MURACK, 2021). Já a privação aguda do sono em camundongos de 1 mês de idade aumentou a densidade de sinapses no hipocampo e diminuiu a eliminação das espinhas no córtex (LI, 2017). Por sua vez, ratos privados de sono entre os 19º e 32º dias pós-natal tiveram os níveis de cinase-cálcio/calmodulina II (CaMKII), um reconhecido marcador da plasticidade sináptica, reduzidos no córtex pré-frontal com 33 e 90 dias de idade (ATROOZ, 2019).

Com base nos estudos descritos, é razoável supor que a privação de sono durante a infância ou período pré-púbere, isto é, período marcado por intensa sinaptogênese em diversas regiões cerebrais, pode acarretar em prejuízos neurocomportamentais por um longo período da vida do indivíduo. Contudo, até o momento existem poucos estudos que investigam as consequências comportamentais da privação de sono em roedores jovens, sendo a maioria deles concentrado nos efeitos deletérios na memória e aprendizado e no comportamento social. De um modo geral, tais estudos mostram resultados compatíveis com os transtornos observados em crianças e adolescentes (MILMAN, 2022). Desta forma, outros efeitos tipicamente observados em crianças e adolescentes privados de sono, como a ocorrência de transtornos afetivos – p. ex. ansiedade e prejuízo da capacidade de lidar com o estresse – merecem mais estudos com modelos experimentais animais.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O objetivo central deste estudo é testar a hipótese de que a privação de sono, durante o período pré-púbere, afeta o comportamento tipo-ansioso e a capacidade de lidar com o estresse.

1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito imediato e tardio da privação de sono no comportamento tipo-ansioso, através do paradigma do teste do labirinto em cruz elevado (LCE);
- b) Avaliar o efeito imediato e tardio da privação de sono na atividade natatória em condições aversivas de desamparo (*helplessness*), através do paradigma do teste de nado forçado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Modelo animal e desenho experimental

O estudo utilizou camundongos suíços que permaneceram alocados no biotério do Laboratório de Neurofisiologia, do Departamento de Fisiologia, e mantidos com livre acesso a ração e água. O biotério permaneceu com temperatura em torno de 21°C, e ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara à 1 hora da manhã. O uso animal foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (Protocolo CEUA 051/2018) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os experimentos realizados estão de acordo com o Guia de Cuidados de Uso de Animais de Laboratório, aplicado e decretado pelo Instituto Nacional da Saúde dos Estados Unidos e com a lei brasileira promulgada em novembro de 2008 (MARQUES, 2009).

Grupos experimentais e controles foram produzidos para a avaliação da privação de sono REM. As ninhadas foram desmamadas e separadas por sexo 22 dias após o nascimento (P22). No dia seguinte (P23), os animais de cada uma das 13 ninhadas utilizadas neste estudo foram distribuídos randomicamente em 3 grupos experimentais: 1) animais submetidos à privação de sono REM pelo método modificado da plataforma múltipla (grupo REMd); 2) animais submetidos aos procedimentos de controle da privação (grupo CONT); ou 3) animais que permaneceram em suas gaiolas de criação (grupo NAÏVE). Os animais foram pareados por sexo e mantidos em uma quantidade de 2 a 4 animais por caixa.

A metade dos animais foi destinada para as análises comportamentais imediatas, isto é, imediatamente após o protocolo de privação de sono, em P26, e a outra metade foi destinada para as análises tardias do comportamento, dez dias após o fim do protocolo de privação de sono (P36), a fim de avaliar a persistência de efeitos comportamentais.

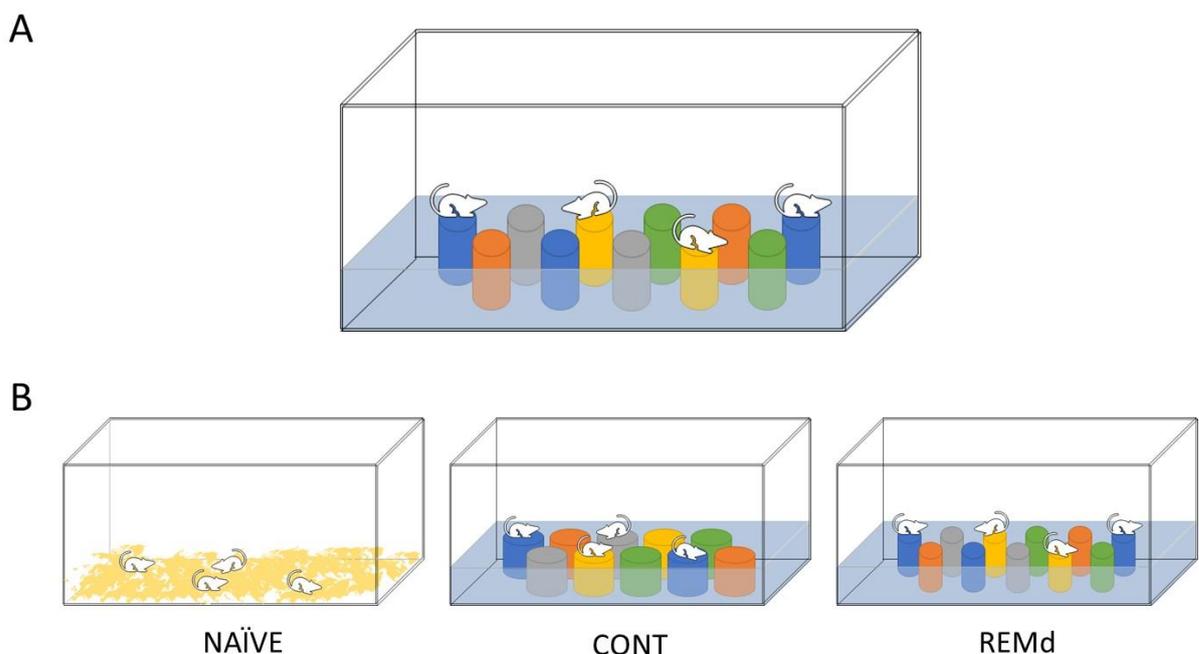
Dessa forma, foram formados ao total seis grupos experimentais, a saber: (NAÏVE-P26: 6 fêmeas e 6 machos), (CONT-P26: 9 fêmeas e 10 machos), (REMd-P26: 5 fêmeas e 6 machos), (NAÏVE-P36: 9 fêmeas e 10 machos), (CONT-P36: 5 fêmeas e 7 machos) e (REMd-P36: 4 fêmeas e 11 machos).

2.2 O modelo de privação de sono REM

Para a indução do modelo de privação de sono REM em camundongos pré-púberes, foi adaptado o método da plataforma múltipla (MACHADO, 2004), em que os animais foram submetidos à privação de sono por um período de 72h. Para a formação dos grupos NAÏVE, CONT e REMd, os animais foram submetidos a três diferentes condições (caixas), conforme a figura 4B, com início na fase clara do ciclo circadiano.

Para tanto, em P23, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico (31cm X 34cm X 23,5cm) parcialmente preenchida com água, contendo 16 plataformas circulares (3 cm de diâmetro), sendo o nível da água 0,5 cm abaixo da superfície das plataformas (Figura 1A). As plataformas foram dispostas sobre a base da caixa, de forma que os animais pudessem se deslocar livremente de uma plataforma para outra, diminuindo assim os níveis de estresse causados pelo isolamento e restrição motora (COLAVITO, 2013). Neste paradigma, quando o estágio do sono REM se inicia, ocorre a perda do tônus muscular e os animais tocam o focinho ou o corpo na água e o sono é interrompido imediatamente. Dessa forma, ocorre uma redução de praticamente 100% do sono REM e de 35% do sono não-REM (MACHADO, 2004). A esse grupo experimental submetido à condição de privação de sono foi denominado REMd (Figura 4A).

Figura 4 – Modelo adaptado do método de plataforma múltipla



Legenda: (A) Caixa-modelo de indução de privação de sono REM (REMd). (B) Grupos controle (NAÏVE e CONT) e experimental (REMd).

Nota: A figura 1A representa o esquema utilizado para a privação de sono no modelo de múltiplas plataformas, com as plataformas de diâmetro reduzido, a fim de garantir a privação do sono REM. Na figura 1B, estão representadas as diferentes condições experimentais utilizadas neste estudo. Os animais do grupo NAÏVE permanecem nas suas gaiolas de criação durante o período de criação; os animais do grupo CONT são colocados sobre plataformas largas que permitem o sono; e os animais do grupo REMd são colocados em plataformas estreitas, que não permitem que os animais atinjam o sono REM.

Fonte: A autora, 2023.

Para observar o efeito exclusivo do estresse pela privação de sono REM, foi desenvolvida a caixa-controle (CONT) com condições semelhantes à caixa-experimental, com quatro plataformas com maior diâmetro (9 cm de diâmetro), a fim de permitir o sono dos animais CONT, mas que ainda mantivessem as condições ambientais semelhantes às do grupo REMd (Fig. 4B).

A fim de excluir os efeitos do estresse por essas condições ambientais, o experimento também foi controlado com o grupo NAÏVE (Fig. 4B), em que os animais eram mantidos em suas caixas de origem, durante todo o experimento.

2.3 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram conduzidos em sequência, sendo realizado primeiramente o teste do labirinto em cruz elevado, sob luz indireta; e em seguida, o teste do nado forçado, sob luz direta. Os animais foram colocados em um período de habituação de 5 minutos antes de cada teste, em salas separadas. Todos os testes foram realizados durante a fase clara do ciclo circadiano (entre 9h e 11h).

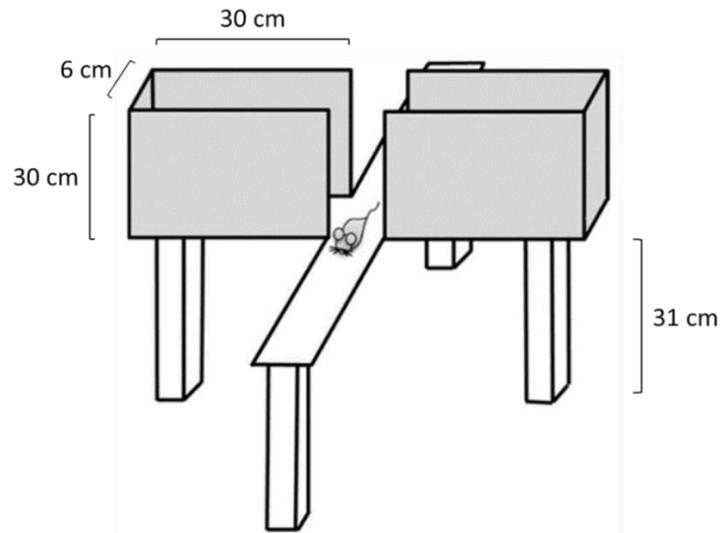
Antes dos testes, todos os animais tiveram sua massa corporal aferida, em P26 e P36. Após a realização dos testes comportamentais necessários e seus respectivos registros em vídeo, os animais foram eutanasiados.

2.3.1 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Para avaliar o comportamento tipo-ansioso, os animais foram submetidos ao Teste do labirinto em cruz elevado (LCE). O labirinto consiste em um equipamento de acrílico com 31 cm de distância do solo e possui quatro braços opostos que se cruzam perpendicularmente em

uma região central (Figura 5): Dois braços são considerados abertos por não haver paredes laterais (30cm x 6cm) e os outros dois denominados braços fechados, pois dispõem das paredes laterais (30cm x 5cm x 30cm).

Figura 5 – Modelo esquemático do labirinto em cruz elevado



Nota: Animais foram submetidos ao teste durante 5 minutos, em sala com luz indireta, durante fase clara do ciclo circadiano. Foram avaliadas as variáveis: entradas nos braços fechados (eBF), tempo nos braços abertos (tBA), percentual de tempo nos braços abertos (%tBA), entradas nos braços abertos (eBA) e percentual de entradas nos braços abertos (%eBA).

Fonte: Adaptado de MARIANO, 2017.

Ao começar o teste, o animal é posicionado no centro do equipamento, de frente para um braço aberto, e então é permitido seu livre deslocamento pelo labirinto. O teste foi gravado em vídeo durante 5 minutos, com uma câmera posicionada acima do equipamento.

Foram calculados o tempo de permanência nos braços abertos, o percentual de tempo nos braços abertos (tempo gasto nos braços abertos dividido pelo tempo gasto nos braços abertos + fechados), o número de entradas nos braços abertos e o percentual de entradas nos braços abertos (entradas nos braços abertos dividido pelas entradas nos braços abertos + fechados). Tais variáveis foram inicialmente utilizadas como medidas de ansiedade, de modo que, quanto mais ansioso é o animal, menores são os valores para as medidas de tempo de permanência e entradas nos braços abertos. O número total de entradas nos braços fechados foi usado como uma medida da atividade locomotora.

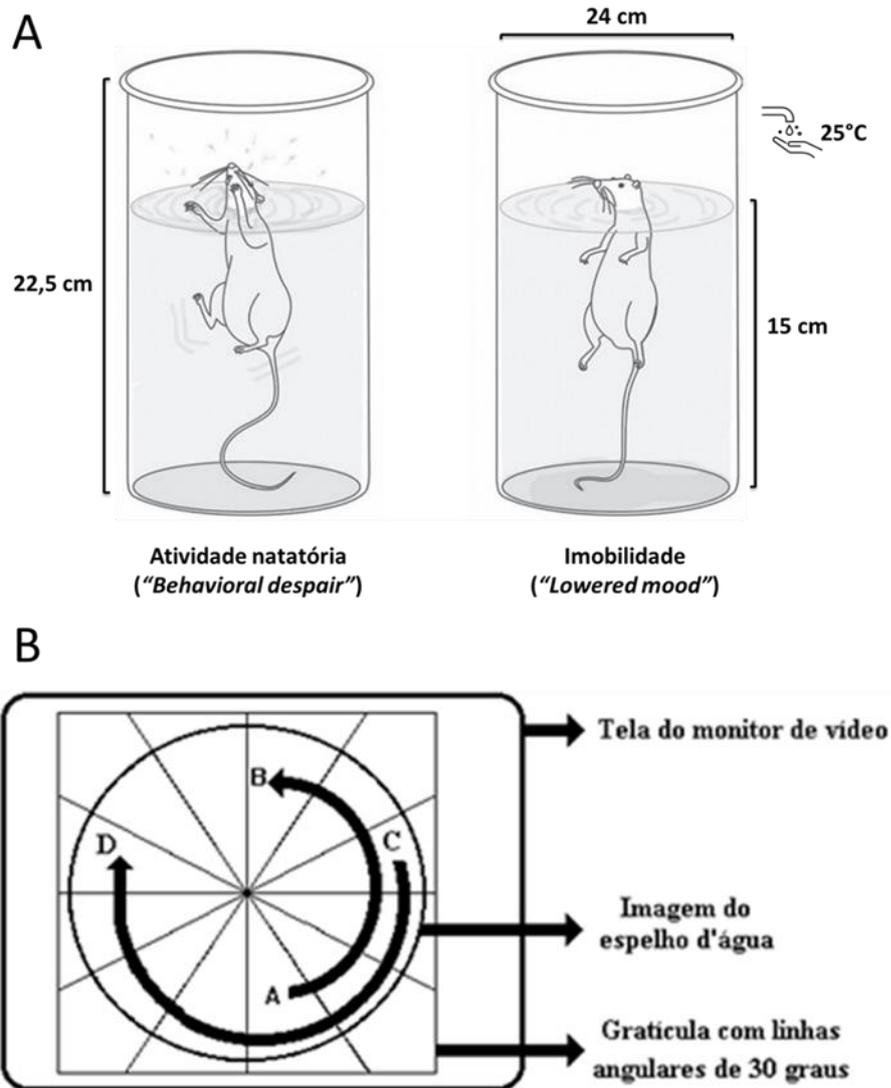
No final de cada sessão, o piso e as paredes do labirinto foram cuidadosamente limpos com solução de 35% de etanol e secos antes do início próxima sessão, e os animais foram encaminhados para o ambiente do teste de nado forçado.

2.3.2 Teste adaptado de nado forçado

Para a avaliação do comportamento tipo-depressivo e rotacional, os animais foram submetidos ao teste de nado forçado. O equipamento para o teste consistia em um recipiente plástico cilíndrico com água (diâmetro do recipiente = 24cm, altura do recipiente = 22,5cm; altura da coluna de água = 15cm, temperatura da água em torno de 25°C), como o de acordo com a Figura 3A.

O tempo total da sessão experimental foi de 5 minutos, e foi subdividido em cinco intervalos consecutivos de 1 minuto, para fins analíticos. As sessões foram registradas por uma câmera de vídeo posicionada a 1 metro acima do recipiente e, portanto, o comportamento foi avaliado a partir do material gravado.

Figura 6 – Modelo esquemático do teste do nado forçado



Nota: (A) Critérios de mobilidade adotados em função dos tipos de comportamento, atividade natatória e imobilidade. Os animais foram submetidos ao teste durante 5 minutos, em sala com luz direta, durante fase clara do ciclo circadiano. (B) Modelo de graticula com seções de 30°, utilizada para a contagem dos deslocamentos angulares. Como exemplos de deslocamentos, temos: de A para B são cruzadas quatro seções em sentido anti-horário, o que equivale a quatro deslocamentos angulares de 30° para a esquerda. De C para D estão esquematizados seis deslocamentos de 30° para a direita (seis seções em sentido horário).

Fonte: Adaptado de ABELAIRA, 2013.

O teste de nado forçado é um dos testes comportamentais que simula uma condição aversiva inescapável, em que prevê um comportamento de desamparo aprendido (*learned helplessness*) (PORSOLT, 1977). Para Porsolt, a imobilidade (*“lowered mood”*) seria um comportamento tipo-depressivo em roedores, enquanto o comportamento ativo (*“behavioral*

despair”) seria um sinal de perseverança, insistência (Figura 6A). As interpretações do teste do nado forçado ainda são objeto de discussão.

Para fins de análise de atividade natatória, é possível avaliar a rotação do animal no teste, conforme indicado pela Figura 6B (FILGUEIRAS, 2004; MANHÃES, 2005; MANHÃES, 2007). Com o auxílio de uma graticula, seções de 30° foram definidas para a avaliação dos deslocamentos para a esquerda (natação no sentido anti-horário) ou para a direita (natação no sentido horário). Para cada unidade de deslocamento, foram marcados os pontos de início e de interrupção do movimento, tomando-se como referência o focinho do animal. Uma volta completa (360°) era constituída por 12 deslocamentos consecutivos e ininterruptos de 30° na mesma direção.

Assim, um deslocamento de 30° só foi considerado quando o animal movimentava-se ativamente. Portanto, o período no qual o animal permaneceu imóvel ou flutuando passivamente foi excluído da análise. A partir da contagem do número de deslocamentos em cada sentido, foi calculado o número total de deslocamentos, que corresponde ao somatório de deslocamentos para a esquerda e a direita. Além disso, o comportamento geral do animal foi observado ao longo da sessão experimental.

2.4 Análises estatísticas

Para todos os testes estatísticos, os resultados foram apresentados em média e erro-padrão da média ($\bar{X} \pm SEM$), e o limite de significância considerado foi de $P < 0,05$ (bi-caudal). A fim de diminuir o efeito de ninhada, as análises estatísticas foram realizadas considerando a média dos valores dos machos e das fêmeas de uma mesma ninhada como dados únicos, e não os valores individuais (WAINWRIGHT, 1998).

O teste exato de Fisher (2×2) foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos com relação às taxas de mortalidade. Análises de variância de repetição (rANOVA) foram realizadas para avaliar os dados de massa corporal durante o período de privação de sono REM (P23 a P26) e o comportamento nos testes de nado forçado. Para avaliar os dados de peso em P36 e o comportamento no labirinto em cruz elevado, foram utilizadas análises de variância univariadas (uANOVA).

A privação de sono (NAÏVE, CONT e REMd) e o sexo foram usados como fatores de classificação (*Between-Subjects Factors*) tanto para as uANOVAs quanto para as rANOVAs. A idade e os intervalos de tempo de 1 minuto foram utilizados como fatores de repetição

(*Within-Subjects Factors*). Para simplificar a apresentação dos resultados das rANOVAs, foram apresentados apenas os resultados dos testes univariados com os graus de liberdade corrigidos pelo método de Greenhouse-Geisser (HUYNH, 1976). Testes de *Fisher's Least Significant Difference* (FLSD) foram utilizados para as análises *post hoc*.

3 RESULTADOS

3.1 Taxa de mortalidade

A maioria dos animais sobreviveu aos procedimentos de indução da privação de sono ou de controle (Tabela 1). Apenas as fêmeas apresentaram óbitos durante o procedimento para a privação de sono REM. Contudo, não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre as taxas de mortalidade dos grupos REMd, CONT e NAÏVE envolvendo toda a amostra ou levando em consideração o sexo dos animais (Teste exato de Fisher: $P > 0,05$).

Tabela 2 – Número de óbitos e taxa de mortalidade após o período de privação de sono

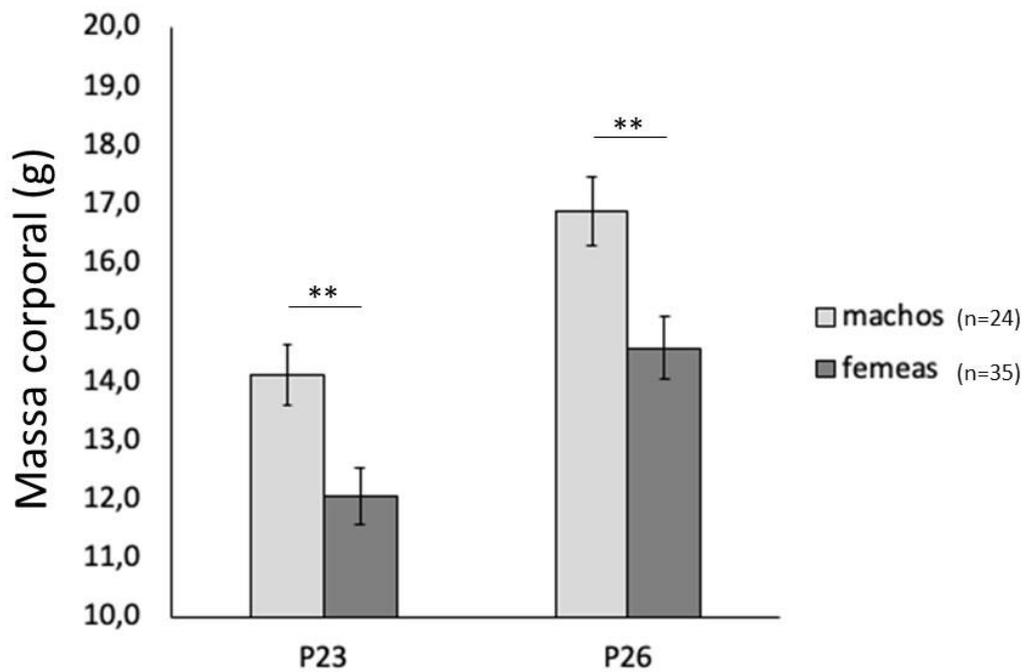
Grupo experimental	Número de animais testados	Número de óbitos Após a privação	Taxa de mortalidade
NAÏVE			
machos	15	0	0
fêmeas	14	0	0
total	29	0	0
CONT			
machos	15	0	0
fêmeas	14	2	14,3%
total	29	2	6,9%
REMd			
machos	16	0	0
fêmeas	13	2	15,4%
total	29	2	6,9%

Legenda: (NAÏVE) Grupo *naive*. (CONT) Grupo controle de privação de sono REM. (REMd) Grupo privado de sono REM.

3.2 Análise de massa corporal

Para a amostra total (independente dos grupos experimentais), houve um marcante aumento da massa corporal durante o período de privação de sono [Efeito da Idade: $F(1/53) = 237,8$; $P < 0,001$]. Neste período, a massa corporal dos machos foi maior do que a das fêmeas [Efeito do Sexo: $F(1/53) = 5,8$; $P < 0,05$] (Gráfico 1) e o ganho massa dos machos (18,2%) foi maior do que o das fêmeas (14,9%) [Interação Sexo x Idade: $F(1/53) = 7,8$; $P < 0,01$].

Gráfico 1 – Massa corporal dos animais antes e após a indução de privação de sono

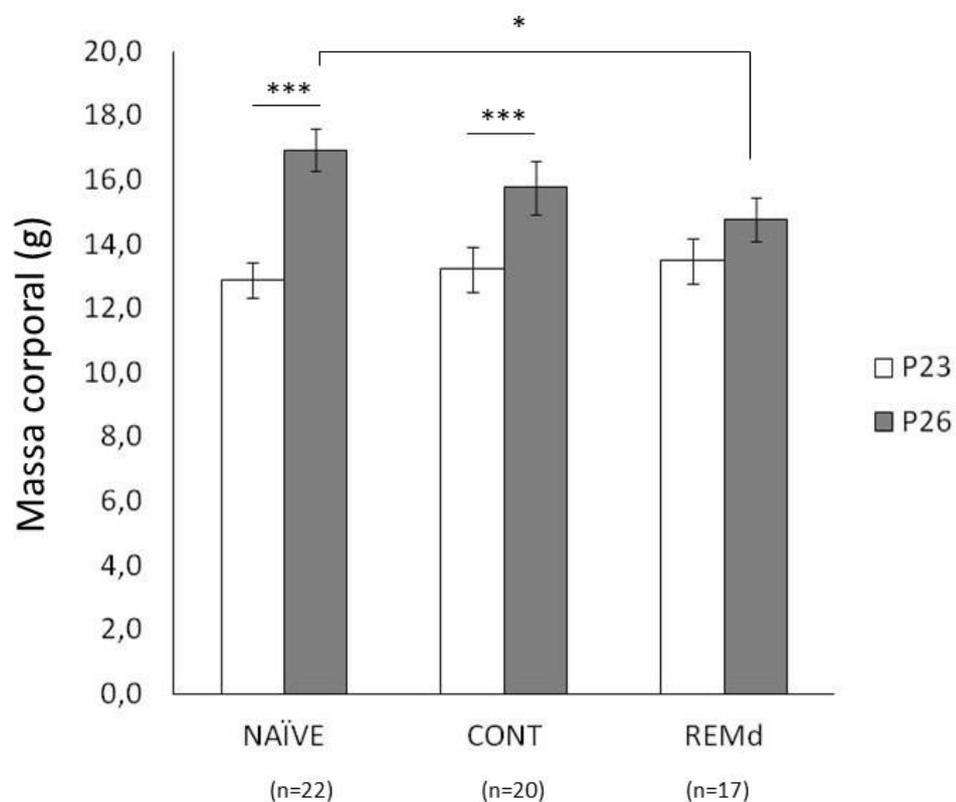


Legenda: Massa corporal de machos e fêmeas no 23º dia pós-natal (P23, imediatamente antes do procedimento para privação de sono) e no 26º dia pós-natal (P26, imediatamente após a privação). (n) Número amostral. (**) $P < 0,01$.

Nota: Valores em Média \pm Erro-padrão da média.

A privação de sono afetou o ganho de massa dos animais, no período de P23 a P26 [Interação Idade x Privação de Sono: $F(2/53) = 55,6$; $P < 0,001$] (Gráfico 2). Em P23, a massa corporal não diferiu entre os grupos NAÏVE, CONT e REMd. De P23 a P26, a massa corporal aumentou significativamente nos grupos NAÏVE e CONT, mas não no grupo REMd. Em P26, a massa corporal do grupo REMd foi significativamente menor que a do grupo NAÏVE, mas não diferiu da do grupo CONT. Não houve interação entre o sexo e a privação de sono para as medidas de massa corporal.

Gráfico 2 – Massa corporal dos grupos antes e após a indução de privação de sono

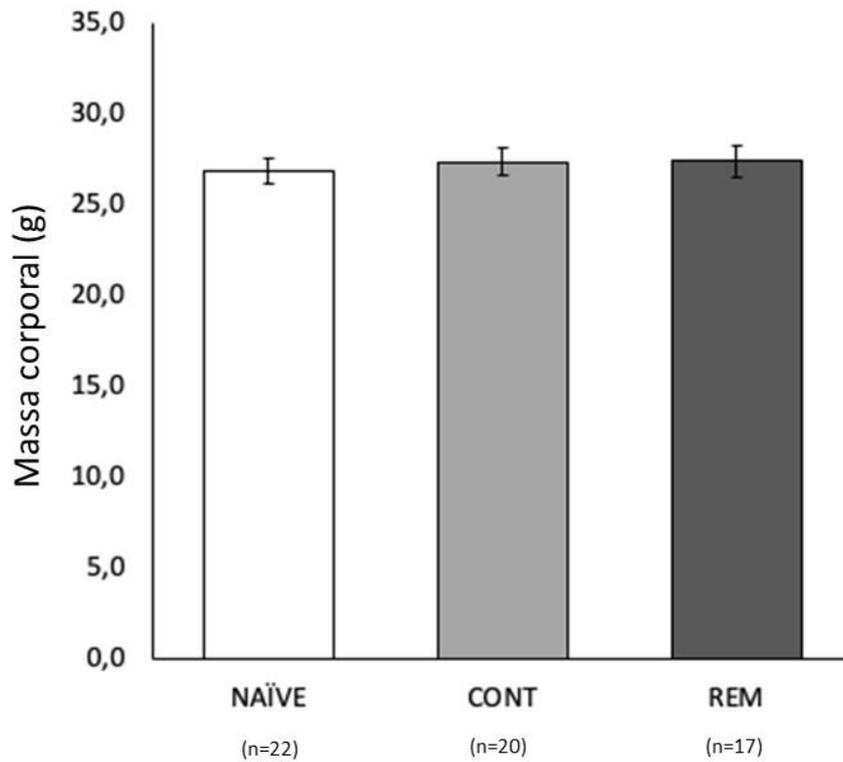


Legenda: Massa corporal dos animais que foram submetidos à privação de sono (REMd), ao procedimento de controle (CONT) ou mantidos em suas gaiolas de criação (NAÏVE). As medidas foram obtidas no 23º dia pós-natal (P23, imediatamente antes do procedimento para privação de sono) e no 26º dia pós-natal (P26, imediatamente após a privação). (n) Número amostral. (*) $P < 0,05$; (***) $P < 0,001$.

Nota: Valores em Média \pm Erro-padrão da média.

Em P36, a massa corporal dos machos ($29,0 \pm 0,5\text{g}$) se manteve maior do que a das fêmeas ($24,8 \pm 0,6\text{g}$) [Efeito do Sexo: $F(1/65) = 32,8$; $P < 0,001$] e não diferiu entre os grupos NAÏVE, CONT e REMd (Gráfico 3). Em P36, não houve interação entre a privação de sono e o sexo.

Gráfico 3 – Massa corporal dos grupos em P36



Legenda: Massa corporal dos animais que foram submetidos à privação de sono (REMd), ao procedimento de controle (CONT) ou foram mantidos em suas gaiolas de criação (NAÏVE). As medidas foram obtidas no 36º dia pós-natal (P36, 10 dias após o período de privação). (n) Número amostral.

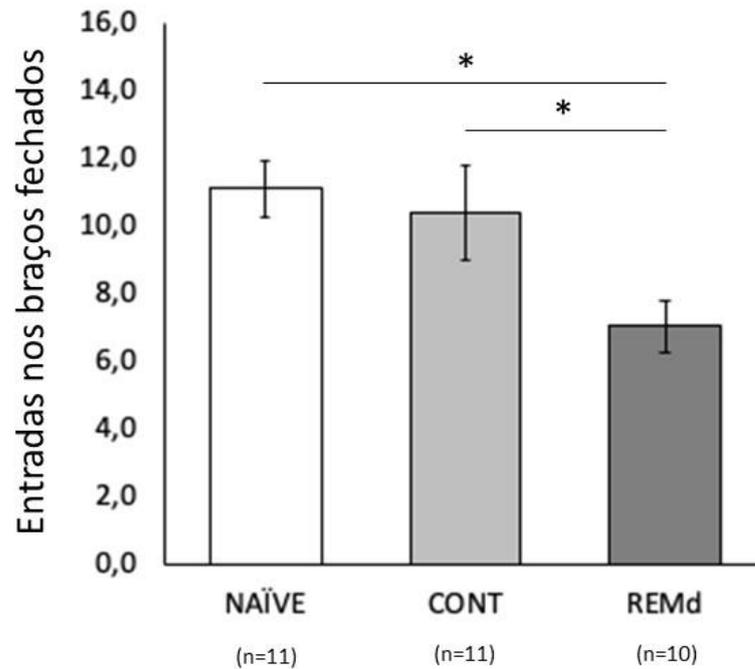
Nota: Valores em Média \pm Erro-padrão da média.

3.3 Teste comportamental do labirinto em cruz elevado

3.3.1 Animais testados imediatamente após a indução da privação de sono

A análise do número de entradas nos braços fechados em P26 indicou que a atividade dos animais do grupo REMd foi significativamente menor que a dos demais grupos [Efeito da Privação de Sono: $F(2/31) = 3,7$; $P < 0,05$] (Gráfico 4). Não houve diferenças envolvendo machos e fêmeas para o número de entradas nos braços fechados.

Gráfico 4 – Atividade deambulatória nos braços fechados, em P26

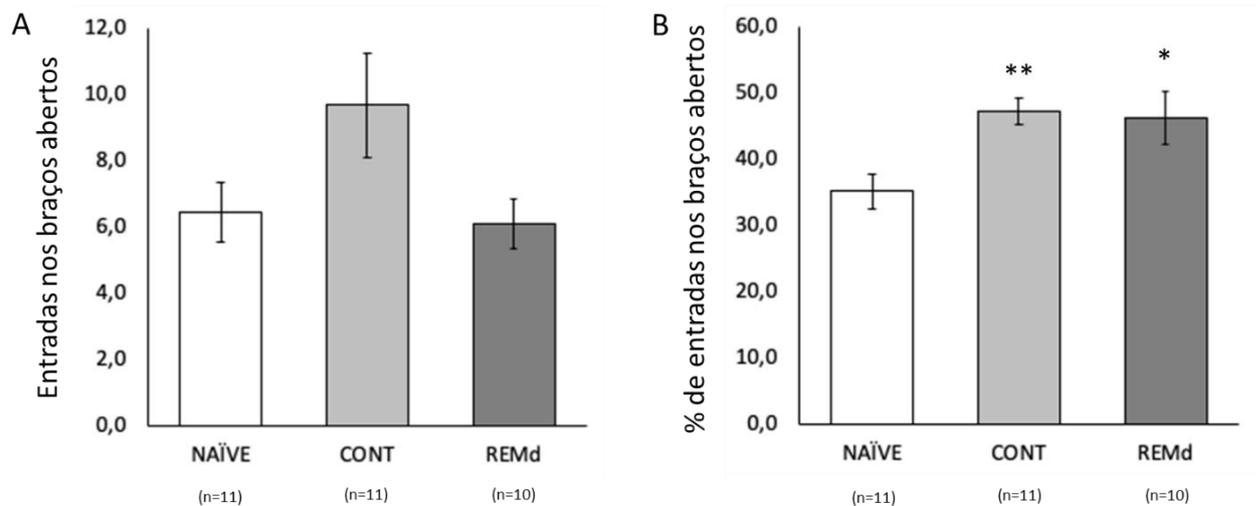


Legenda: Número de entradas nos braços fechados de animais testados em P26. (n) Número amostral. (*) $P < 0,05$.

Nota: Valores em Média ± Erro-padrão da média. Notar que a atividade do grupo REMd foi menor que a dos demais grupos.

O número de entradas nos braços abertos não diferiu entre os animais dos grupos NAÏVE, CONT e REMd (Gráfico 5A). Contudo, o percentual de entradas nos braços abertos indicou que os valores dos animais do grupo NAÏVE foram significativamente menores que o dos grupos CONT e REMd (Gráfico 5B). Não foram observadas diferenças envolvendo machos e fêmeas no número de entradas e no percentual do número de entradas nos braços abertos.

Gráfico 5 – Atividade deambulatória em braços abertos, em P26

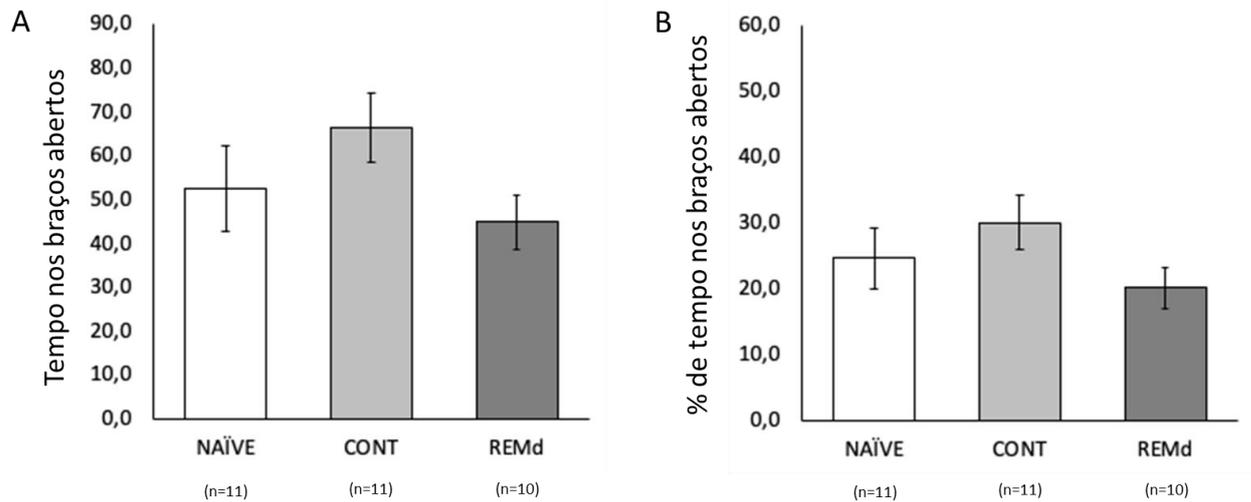


Legenda: Número de entradas nos braços abertos (A) e percentual de entrada nos braços abertos (B) dos animais testados em P26 (n) Número amostral. (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.

Nota: Valores em Média \pm Erro-padrão da média. Notar em B que a atividade do grupo NAÏVE foi menor que a dos demais grupos.

As análises das medidas de tempo de permanência e do percentual do tempo de permanência nos braços abertos não indicaram diferenças entre os animais dos grupos NAÏVE, CONT e REMd (Gráfico 6), nem tampouco diferenças envolvendo machos e fêmeas.

Gráfico 6 – Tempo de permanência nos braços abertos, em P26.



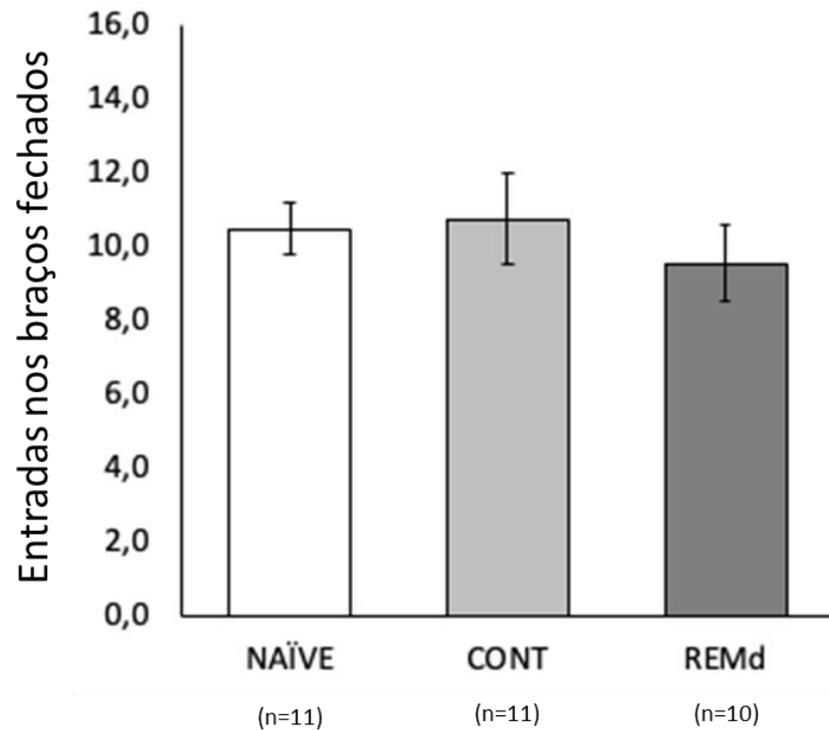
Legenda: Tempo de permanência nos braços abertos (A) e percentual de tempo de permanência nos braços abertos (B) dos animais testados em P26. (n) Número amostral.

Nota: Valores em Média \pm Erro-padrão da média.

3.3.2 Animais testados 10 dias após a indução da privação de sono

A análise do número de entradas nos braços fechados, em P36, indicou que não houve diferenças na atividade dos animais dos grupos NAÏVE, CONT e REMd [Efeito da Privação de Sono: $F(2/34) = 0,4$; $P = 0,71$] (Gráfico 7). Também não foram observadas diferenças envolvendo machos e fêmeas.

Gráfico 7 – Atividade deambulatória nos braços fechados, em P36

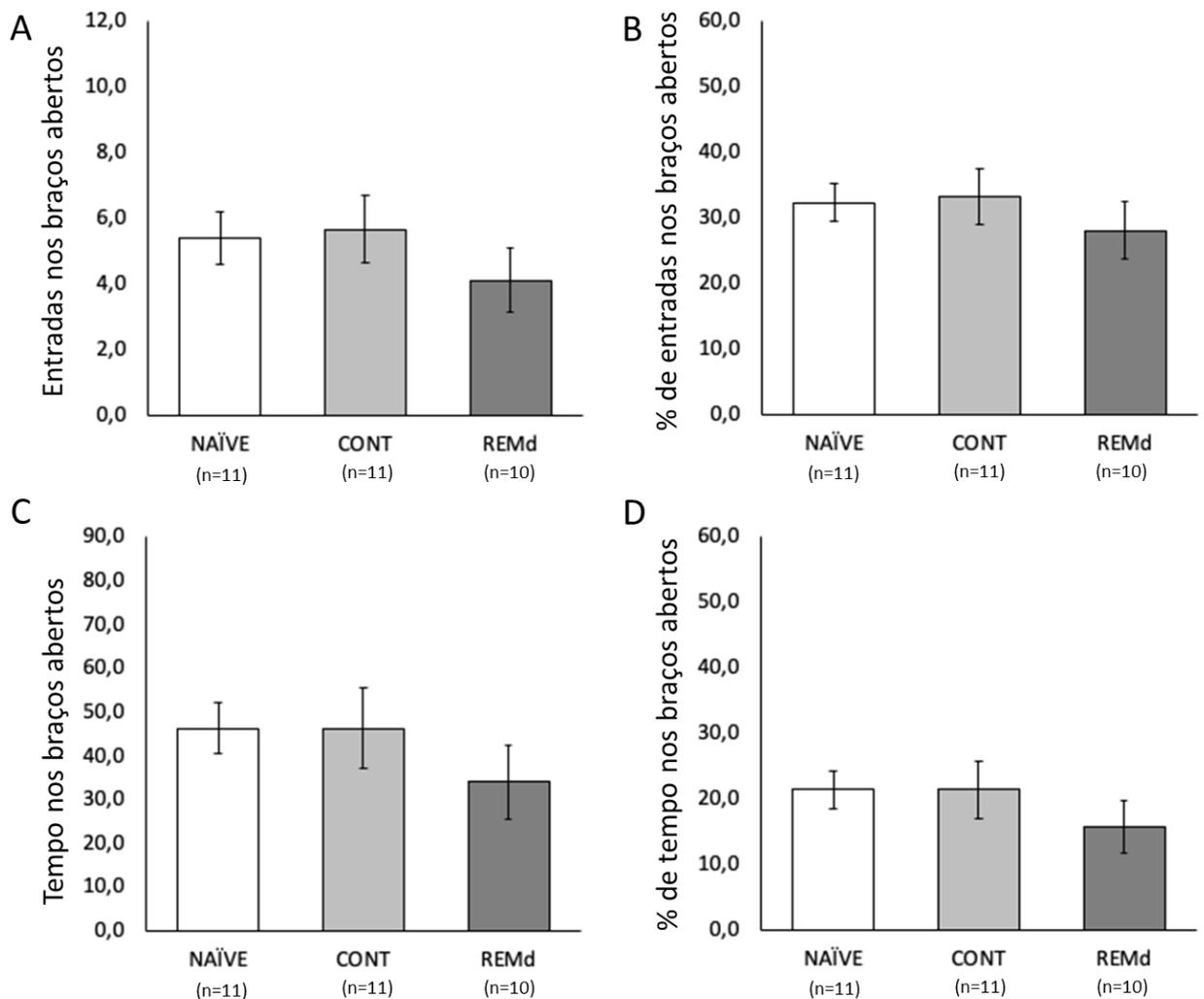


Legenda: Número de entradas nos braços fechados dos animais testados em P36. (n) Número amostral.

Nota: Valores em Média \pm Erro-padrão da média.

Em P36, também não foram observadas diferenças entre os animais dos grupos NAÏVE, CONT e REMd para o número de entradas nos braços abertos (Gráfico 8A), o percentual de entradas nos braços abertos (Gráfico 8B), tempo de permanência nos braços abertos (Gráfico 8C) e percentual tempo de permanência nos braços abertos (Gráfico 8D). Também não houve diferenças entre machos e fêmeas.

Gráfico 8 – Entrada em braços abertos, em P36



Legenda: Número de entradas nos braços abertos (A), percentual de entrada nos braços abertos (B), latência nos braços abertos (C), percentual de tempo de permanência nos braços abertos (D) dos animais testados em P36. (n) Número amostral.

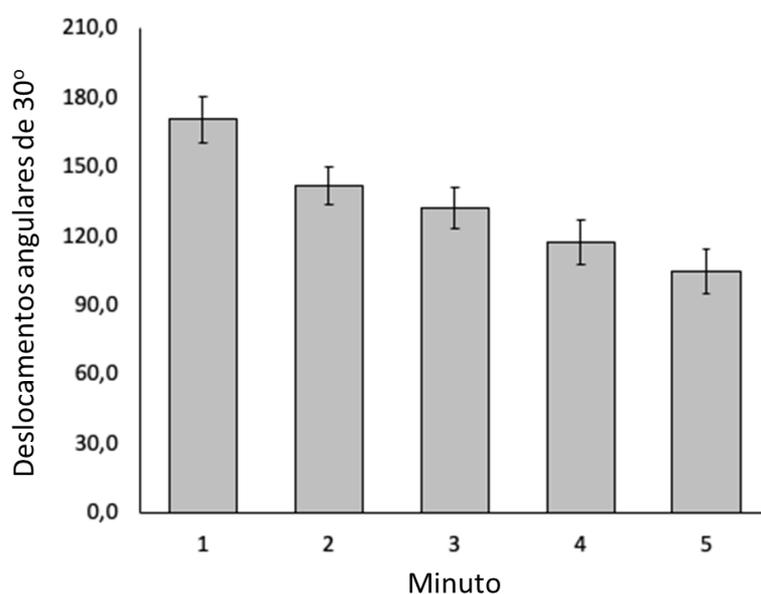
Nota: Valores em Média \pm Erro-padrão da média.

3.4 Teste comportamental do nado forçado

3.4.1 Animais testados imediatamente após a indução da privação de sono

Para a amostra total (independente dos grupos experimentais), a atividade natatória diminuiu significativamente do primeiro para o último intervalo de tempo [Efeito do Intervalo de tempo: $F(4,0/47,8) = 16,0$; $P < 0,001$] (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Atividade natatória dos animais ao longo do tempo, em P26

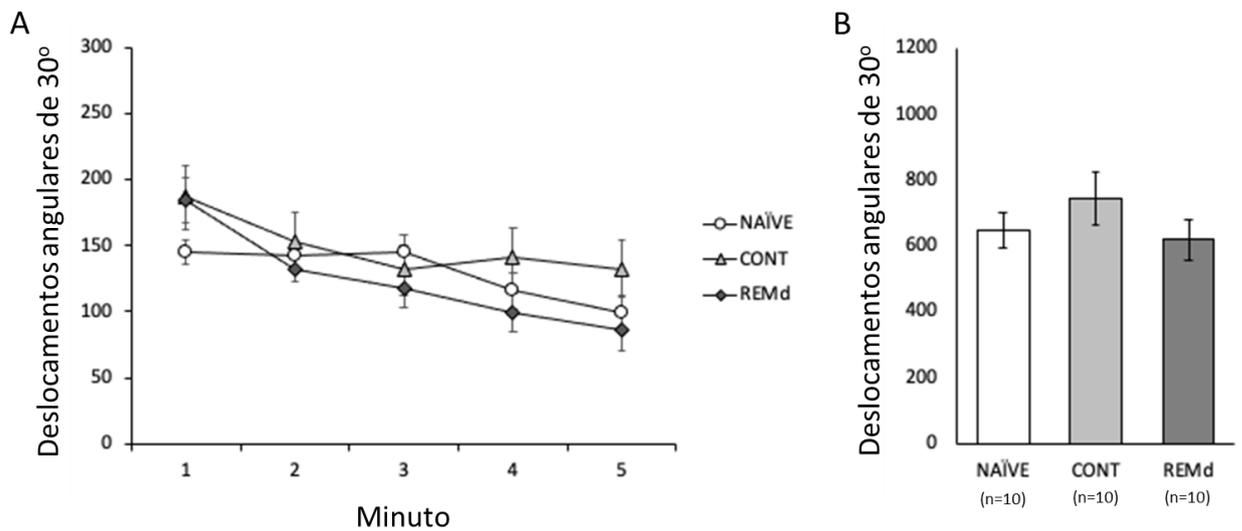


Legenda: Atividade natatória ao longo dos 5 intervalos de 1 minuto dos animais testados em P26.

Nota: Valores em Média \pm Erro-padrão da média. Notar a queda de atividade do primeiro para o quinto intervalo de tempo.

Não foram observadas diferenças entre os grupos NAÏVE, CONT e REMd com relação à queda de atividade ao longo dos intervalos, nem em relação à atividade no tempo total da sessão (Gráfico 10). Também não foram encontradas diferenças envolvendo o sexo.

Gráfico 10 – Atividade natatória, em função da privação de sono, em P26



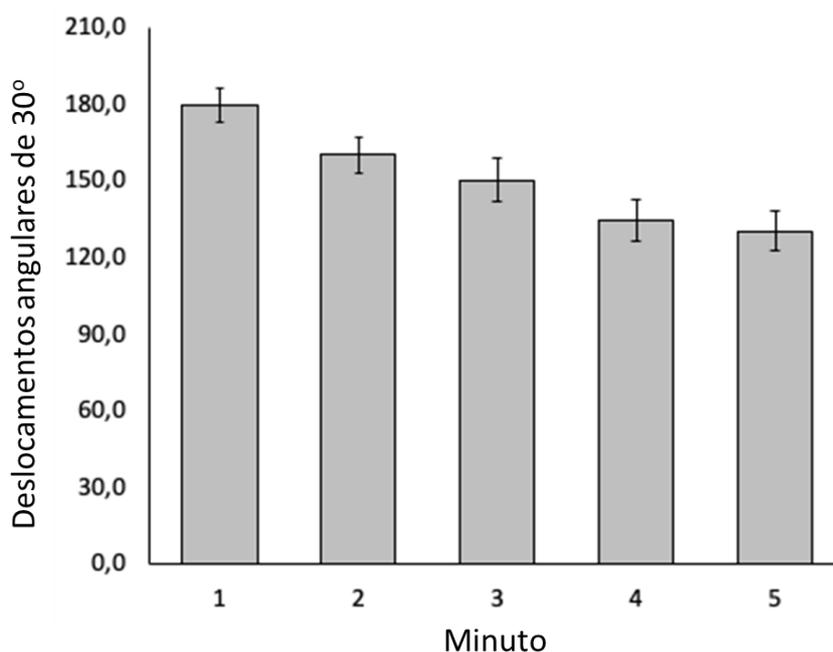
Legenda: Atividade natatória ao longo dos 5 intervalos de 1min (A) ou no tempo total do teste (B) dos animais testados em P26. (n) Número amostral.

Nota: Valores em Média \pm Erro-padrão da média.

3.4.2 Animais testados 10 dias após a indução da privação de sono

Para a amostra total (independente dos grupos experimentais), a atividade natatória diminuiu significativamente do primeiro para o último intervalo de tempo [Efeito do Intervalo de tempo: $F(4,0/116,0) = 11,2$; $P < 0,001$] (Gráfico 11).

Gráfico 11 – Atividade natatória dos animais ao longo do tempo, em P36

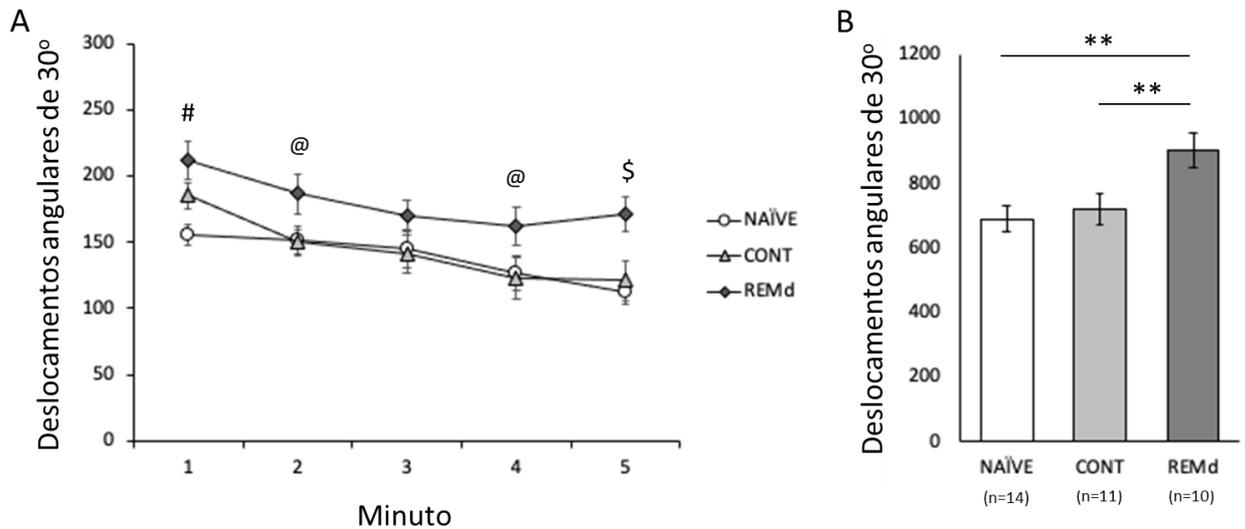


Legenda: Atividade natatória ao longo dos 5 intervalos de 1 minuto dos animais testados em P36.

Nota: Valores em Média \pm Erro-padrão da média. Notar a queda de atividade do primeiro para o quinto intervalo de tempo.

Em P36, os animais do grupo REMd apresentaram uma atividade natatória significativamente maior do que os animais dos grupos CONT e NAÏVE, que não diferiram entre si [Efeito da Privação de Sono: $F(2/29) = 6,2$; $P < 0,01$] (Gráfico 12). Não foram encontradas diferenças envolvendo o sexo.

Gráfico 12 – Atividade natatória, em função da privação de sono, em P36



Legenda: Atividade natatória ao longo dos 5 intervalos de 1min (A) ou no tempo total do teste (B) dos animais testados em P36. (n) Número amostral. (#) NAÏVE < REMd: $P < 0,05$; (@) CONT < REMd: $P < 0,05$; (\$) REMd > NAÏVE: $P < 0,05$ e REMd > CONT: $P < 0,05$.

Nota: Valores em Média ± Erro-padrão da média.

4 DISCUSSÃO

4.1 Considerações metodológicas sobre o modelo de privação de sono

É importante notar que os modelos animais de privação de sono podem apenas reproduzir parcialmente a insônia humana. Com relação aos roedores, essa afirmação é geralmente apoiada na inversão de fase do ciclo circadiano e no padrão estrutural do sono (COLAVITO, 2013; REVEL, 2009). Quanto à inversão de fase, roedores experimentais possuem hábitos noturnos e, portanto, passam a maior parte do dia descansando, enquanto à noite, em baixa luminosidade, apresentam a fase ativa do comportamento.

Quanto ao padrão estrutural do sono, esses animais são tipicamente polifásicos, isto é, apresentam episódios repetidos de sono durante o ciclo claro-escuro de 12h/12h. No entanto, esses animais levam cerca de 70 a 80% do período escuro acordados, enquanto 70 a 80% do período claro dormindo (COLAVITO, 2013), confirmando a inversão de ciclo em relação aos humanos. O fato de que o sono dos roedores é fisiologicamente fragmentado pode representar, por si só, um modelo de insônia e, neste sentido, a privação do sono promovida pelos diferentes métodos pode ser interpretada como um modelo de aumento da privação de sono em ratos e camundongos (REVEL, 2009).

Outro aspecto que deve ser considerado na interpretação dos resultados obtidos com modelos animais é a distinção que se faz entre a insônia relacionada à ou associada com uma condição psiquiátrica, desordem fisiológica ou tratamento farmacológico qualquer (insônia comórbida) daquela que se manifesta de modo independente de outros fatores (insônia primária) (COLAVITO, 2013; REVEL, 2009). Nesse sentido, alguns autores sugerem que, enquanto os mecanismos que causam insônia não forem completamente compreendidos em humanos, uma reprodução precisa da insônia primária em animais não será possível (REVEL, 2009; RICHARDSON, 2007).

Como não é possível um modelo ideal, é importante estar ciente das limitações de cada método. Para mimetizar um estado de insônia, muitos modelos usam alterações de fatores ambientais a fim de perturbar o sono fisiológico, como agentes farmacológicos, modificações genéticas, estresse crônico, e outros. Dessa forma, o método de plataformas múltiplas, utilizado em nosso estudo, foi inicialmente desenvolvido para atingir a privação específica do sono REM, devido à sua simplicidade, viabilidade e popularidade entre os modelos de privação de sono.

No entanto, o modelo apresenta algumas limitações, incluindo a clara falta de seletividade para privação do sono REM, a dificuldade em estabelecer um controle adequado e a indução de

um estresse acentuado aos animais, inerente ao modelo, como uma certa restrição de movimento e a alta umidade do aparato (REVEL, 2009). Alguns desses problemas foram resolvidos com modificações da técnica, como a privação simultânea do sono de vários animais em um mesmo tanque com água, contendo mais plataformas do que animais (método adaptado de plataformas múltiplas), permitindo interações sociais e movimentação entre plataformas (MACHADO, 2004; SUCHECKI, 2000).

Ao final do período de privação de sono, os roedores não adormecem prontamente quando retornam à sua gaiola, como seria de se esperar. Em vez disso, ocorre um período de insônia com duração de cerca de 30 minutos, durante o qual os animais apresentam uma variedade de sintomas, incluindo hiperatividade, irritabilidade, agressividade, hipersexualidade e estereotípias (REVEL, 2009). Acredita-se que esse fenômeno seja consequência da carga de estresse que ocorre no tanque com água, no qual a privação do sono REM é apenas um fator. Assim, esse paradigma foi proposto como um modelo de insônia induzida por estresse (GESSA, 1995). Tal estresse foi controlado, em nosso estudo, pelo grupo NAÏVE, onde os animais permaneciam em suas gaiolas de origem.

No presente estudo, foram observados óbitos tanto no grupo controle como no grupo privado de sono. Além disso, os animais do grupo Controle (CONT) e do grupo experimental (REMd) que foram testados imediatamente após o período de privação (P26) apresentaram uma redução no percentual de entradas nos braços abertos do LCE.

Em conjunto, esses dados sugerem que, mesmo quando os animais têm a possibilidade de dormir, o estresse induzido pelo ambiente com água pode ter efeito significativo. Para confirmar tal possibilidade é fundamental a realização da dosagem dos níveis de corticosterona ao longo dos dias em que os animais forem submetidos a procedimentos de privação de sono ou de controle.

Além disso, não se pode desconsiderar a possibilidade de que, devido a esse estresse ambiental, algum grau de privação de sono também ocorra no grupo Controle (CONT). Para investigar essa possibilidade, são necessárias a realização e a verificação de filmagens dos animais durante o período de 72 horas.

4.2 Ganho de massa corporal durante o período de privação de sono

Em contraste com os animais dos grupos NAÏVE e CONT, os animais do grupo REMd não apresentaram um aumento significativo na massa corporal durante o período de privação de sono. Esse achado está de acordo com trabalhos realizados em camundongos que mostraram que os animais tendem a não ganhar peso durante a privação de sono (BARF, 2010; BARF, 2012).

A ausência de ganho de massa corporal tem sido associada a um aumento global no gasto energético sem um aumento correspondente na ingesta alimentar (BARF, 2010; BARF, 2012). O aumento no gasto energético causado pela privação de sono pode estar associado a uma maior ativação simpática, um aumento na lipólise e aumento na atividade locomotora (BARF, 2012). Curiosamente, em nosso estudo, os dados do peso da ração no início e ao final do período de privação sugerem um aumento na ingesta de ração no grupo REMd. Este dado está em acordo com alguns estudos que mostraram hiperfagia em ratos privados de sono, o que indica uma tentativa compensatória do uso de energia (GALVÃO, 2009; KOBAN, 2008; RECHTSCHAFFEN, 1995).

Mesmo nesses estudos com hiperfagia, os ratos privados de sono perderam peso em comparação com os controles. Não está claro qual seria a explicação para essa variação na ingestão de alimentos. Vários fatores de interação podem estar envolvidos, incluindo um artefato intrínseco ao método de privação, em que o estresse pelo contato com a água assim que adormecem poderia levar os animais a terem efeitos inespecíficos no metabolismo e no comportamento alimentar (BARF, 2012; KNUTSON, 2012).

Também é possível sugerir, considerando a pequena superfície das plataformas do grupo experimental, que a maior parte da ração roída pelos animais caía na água do tanque, inviabilizando a ingestão. Desta forma, não se pode descartar completamente que o menor ganho de massa do grupo REMd esteja relacionado a um menor consumo efetivo de ração neste grupo.

Dez dias após a privação de sono, em P36, não foram observadas diferenças na massa corporal entre os animais privados de sono e os dos demais grupos. Esse resultado sugere que, independentemente das razões que levaram à diminuição no ganho de massa, animais privados de sono REM conseguem recuperar a massa corporal. Este fato não descarta a possibilidade de que os animais do grupo REMd apresentem tardiamente alterações na massa corporal. De fato, estudos apontam que a restrição do sono traz consequências que podem perdurar por um longo período (KNUTSON, 2012; OLIVEIRA, 2015).

A privação de sono tem sido considerada como um fator de predisposição para o ganho de peso tardio, de modo que alterações metabólicas durante a privação de sono parecem programar o tecido adiposo (OLIVEIRA, 2015). Este resultado está de acordo com o fenômeno conhecido como programação metabólica, no qual roedores, quando submetidos a um evento precoce, como por exemplo, a desnutrição durante o período de lactação, desenvolvem obesidade na vida adulta (OLIVEIRA, 2015; MOURA, 2008).

4.3 Comportamento no labirinto em cruz elevado: atividade nos braços abertos

O LCE é um teste amplamente utilizado para a análise do comportamento tipo-ansioso em roedores, para a avaliação do potencial ansiolítico de agentes farmacológicos, e para o estudo das bases neurobiológicas da ansiedade (DALVI, 1996; GRIEBEL, 1997; RODGERS, 1997).

De modo geral, cada sessão experimental dura 5 minutos, em que o animal é inserido individualmente no centro do aparato e, como se trata de um ambiente novo, o camundongo é motivado a explorar. Contudo, essa exploração não é igualmente distribuída por todos os setores do LCE. Estudos comprovam que os braços abertos geram comportamentos de esquia e, portanto, os animais evitam esse compartimento.

Esse comportamento tem sido interpretado a partir de uma perspectiva evolucionista, em que assume que pequenos roedores, como ratos e camundongos, foram filogeneticamente selecionados para exibir respostas de medo ou ansiedade basais em situações de risco potencial, como por exemplo, espaços abertos (PALANZA, 2001; CHOLERIS, 2001). Alguns autores especulam, portanto, que o comportamento no LCE reflete uma situação de conflito, uma vez que os animais buscam avançar para os braços abertos, em uma atitude exploratória, mas afastam-se para os braços fechados devido ao medo (CRUZ, 1994; FERNANDES, 1996; LISTER, 1987).

Neste estudo, observou-se diferenças significativas apenas naqueles animais que realizaram o teste do LCE imediatamente após o período de privação, isto é, em P26. Em relação aos indicadores de comportamento tipo-ansioso, tanto os animais que foram privados de sono (REMd) como os que foram submetidos aos procedimentos de controle apresentaram um percentual de entradas nos braços abertos maior do que os animais que foram mantidos em suas gaiolas de criação durante o período de privação.

Se considerarmos que um aumento na atividade ou permanência nos braços abertos sugere uma diminuição no comportamento tipo-ansioso e que não foram observadas diferenças entre os animais dos grupos CONT e REMd, nossos resultados sugerem um efeito ansiolítico não restrito à privação de sono, mas provavelmente decorrente do estresse envolvido com os procedimentos experimentais para a privação de sono. Este dado contrasta com alguns estudos realizados em roedores que mostram que tanto a privação de sono como o estresse durante o período juvenil promovem um aumento nos níveis de ansiedade (ROCHA-LOPES, 2018; JOHNSON, 2018; MILMAN, 2022; SIMIONATO, 2022).

É importante notar que nesses estudos que mostraram um aumento no comportamento tipo-ansioso, os períodos de privação ou estresse foram mais longos que os do presente estudo, variando de 6 dias (1h/dia de estresse por isolamento) (JOHNSON, 2018) até 21 dias (privação de sono REM por 18h/dia) (ROCHA-LOPES, 2018; SIMIONATO, 2022). De modo semelhante ao observado em nosso estudo, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 submetidos a 3 dias de estresse por restrição de movimentos (2h/dia) em idade juvenil apresentaram um aumento no número de entradas nos braços abertos do LCE 24 horas após o último dia de restrição (SADLER, 2016). Desta forma, é possível especular que, em idade juvenil, um efeito ansiogênico ou ansiolítico depende da duração do período de estresse ou privação de sono que os animais são expostos.

Com base no exposto acima, nossa hipótese é que um curto/médio período de exposição a ambientes/situações que geram altos níveis de estresse e ansiedade (como os tanques com água ou a imobilização por contenção) pode deixar os animais menos responsivos em ambientes que gerem menores níveis de estresse e ansiedade (como os braços abertos do LCE).

Em contraste, um longo período de exposição ambientes/situações que geram altos níveis de estresse e ansiedade pode produzir alterações mais profundas que comprometem a função dos sistemas que medeiam a resposta ao estresse ou dos circuitos geradores de ansiedade e deixar os animais mais responsivos do que o normal em ambientes que geram menores níveis de estresse e ansiedade.

Alternativamente, não podemos descartar ainda a hipótese que os altos níveis de estresse gerados durante as 72 horas de permanência nos tanques com água ou decorrentes da imobilidade por contenção (SADLER, 2016) tenham interferido com a capacidade de avaliação de risco dos animais e, portanto, o aumento relativo na exploração dos braços abertos não reflita uma diminuição no comportamento tipo-ansioso, mas sim, um comportamento mal-adaptado.

De acordo com essa ideia, estudos realizados em humanos sugerem que a privação de sono se relaciona positivamente com comportamentos de risco e com a redução na atividade do córtex pré-frontal ventromedial (WOMACK, 2013). Em roedores, contudo, os resultados são controversos, sugerindo que a privação de sono pode tanto aumentar ou como diminuir comportamentos de risco (LEENAARS, 2021).

Em contraste ao observado nos animais testados em P26, no grupo de animais testados no LCE em P36 não foram observadas diferenças entre os grupos NAÏVE, CONT e REMd. Este resultado sugere que, independente de ter havido um efeito ansiolítico ou um prejuízo na capacidade de julgamento, este efeito foi transitório e, 10 dias após o término do período de privação de sono ou dos procedimentos de controle, os animais se recuperaram.

4.4 Comportamento no labirinto em cruz elevado: atividade nos braços fechados

A análise do número de entradas nos braços fechados, que é uma medida amplamente utilizada para acessar a atividade locomotora no LCE (WALF, 2007), revelou que os animais do grupo REMd testados em P26 apresentaram um número de entradas nos braços fechados significativamente menor que o dos demais grupos. Considerando que os animais foram testados após um período de 72 horas de privação de sono, é possível que a hipoatividade locomotora advinha de alguns animais terem dormido ou apresentado períodos de imobilidade durante a sessão. Contudo, estes comportamentos não foram observados durante a análise das imagens.

Em contraste com nossos resultados, estudos realizados em ratos adultos demonstraram que ao final do período de 72-96h de privação de sono, os animais não dormem prontamente quando retornam às suas gaiolas. Ao invés disso, permanecem pelo menos 30 minutos sem dormir e apresentam hiperatividade, irritabilidade hipersexualidade e estereotípias (GESSA, 1995; HICKS, 1979; REVEL, 2009). Esse fenômeno pode ser consequência da carga de estresse a que os animais são submetidos no tanque com água, no qual a privação de sono REM é apenas um fator (GESSA, 1995; REVEL, 2009). A hiperatividade locomotora observada após a privação de sono REM tem sido associada ao aumento nos níveis de noradrenalina no cérebro, que promove (via aumento na atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$) um aumento na excitabilidade cerebral (MALLICK, 2010; VOGEL, 1975).

Em um estudo realizado em nosso laboratório, também se demonstrou que camundongos suíços pré-púberes privados de sono REM por 24 horas apresentaram um aumento da atividade locomotora na periferia do campo aberto (SANTOS, 2021). Contudo, quando os animais foram privados de sono por 48 horas, a atividade locomotora não foi diferente dos animais submetidos aos grupos Controle (CONT) ou NAÏVE na periferia do campo aberto (SANTOS, 2021), nem tampouco no número de entradas nos braços fechado do LCE (GONÇALVES, 2022).

Desta forma, se considerarmos que a atividade na periferia do campo aberto tem a mesma natureza da atividade medida nos braços fechados do LCE, é possível especular que em animais juvenis ou pré-púberes a privação de sono tenha um efeito dependente do tempo de privação na atividade locomotora. Particularmente, em um primeiro momento, a privação de sono induziria um aumento na atividade locomotora que, com o passar do tempo de privação, diminuiria progressivamente até se inverter e promover a redução da atividade locomotora.

4.5 Queda de atividade ao longo do teste de nado forçado

De acordo com os resultados apresentados por uma série de estudos, houve uma queda marcante na atividade natatória ao longo dos 5 minutos de teste de nado forçado. Alguns autores sugerem que essa redução da atividade poderia ser decorrente do aprimoramento das "técnicas de natação", em que os animais aprenderiam a nadar de modo mais eficiente e com menor gasto de energia (WEST, 1986).

A redução de atividade natatória pode ser associada, ainda, ao aumento da imobilidade apresentada por roedores quando expostos repetidamente a situações aversivas das quais não podem escapar. Quando ratos ou camundongos são colocados em recipientes restritos com água, inicialmente tentam escapar, e após um determinado tempo, alternam períodos de atividade natatória com períodos de imobilidade (PORSOLT, 1977; PORSOLT, 1978; PORSOLT, 1981). Em sessões subsequentes, o início do período de imobilidade é mais rápido e mais bem marcado (ALONSO, 1991; PORSOLT, 1981; WILLNER, 1990).

É pouco provável que a redução de atividade esteja relacionada a um aumento do comportamento de imobilidade, uma vez que nas condições em que os animais foram testados o tempo médio de imobilidade é muito baixo (média 12s, DP = 18 s; variando de 0 a 77 segundos) (KRAHE, 2002). Esse fato pode estar relacionado ao diâmetro do recipiente de teste utilizado neste estudo (24 cm) que favorece a manifestação de comportamentos ativos, como a natação e as tentativas de escalada na parede do recipiente (BOGDANOVA, 2013; ROSAS-SÁNCHEZ, 2022). Além disso, o fato de que neste estudo os animais não terem tido a possibilidade de tocar o fundo do recipiente de teste também contribuiu para os animais apresentarem tempos de imobilidade muito baixos (ABEL, 1994).

No teste de nado forçado, os animais, enquanto ativos, parecem tentar escapar da situação aversiva do teste. Dessa forma, a queda de atividade natatória observada do primeiro para o segundo minuto da sessão pode refletir um fenômeno de habituação com redução das tentativas de fuga e não a fadiga (SCHMIDT, 1999).

De fato, quando colocados na arena aquática pela primeira vez, o comportamento dos animais é caracterizado por vigorosa natação acompanhada de tentativas intensas de escalar a parede do recipiente (KRAHE, 2002, SCHMIDT, 1999). Na medida que o tempo passa, os animais apresentam um aumento na frequência e duração dos episódios de imobilidade e uma marcante diminuição nas tentativas de fuga (COMMONS, 2017; KLOET, 2016; KRAHE, 2002; SCHMIDT, 1999). Como não foram observadas diferenças nas quedas de atividade ao longo dos intervalos de tempo entre os animais dos grupos REMd, CONT e NAÏVE, é possível especular

que a privação de sono ou o estresse associado ao procedimento de privação não interferem com os processos de habituação à situação aversiva do teste.

4.6 Aumento da atividade natatória nos animais privados de sono

Em P26, não foram observadas diferenças entre os grupos no teste de nado forçado. Contudo, em P36, os animais privados de sono REM apresentaram uma atividade natatória significativamente maior do que a dos animais dos demais grupos. Conforme mencionado anteriormente, assim que os animais são colocados na arena aquática, esses apresentam uma atividade vigorosa e, frequentemente, tentam escalar a parede do recipiente de teste e que, com a repetição das sessões e a habituação do animal à condição experimental, tanto atividade natatória como as tentativas de fuga se tornam menos evidentes (KRAHE, 2002; SCHMIDT, 1999).

A resposta adaptativa ao lidar com a situação estressante do teste que envolve a troca de estratégias ativas para passivas tem sido associada a uma ativação do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (KLOET, 2016; CABIB, 2012). Particularmente, altos níveis de ativação tônica do sistema dopaminérgico dão suporte à execução das repostas defensivas custosas e de alto risco que caracterizam as estratégias de lidar com o estresse (*coping*), visto que baixos níveis de ativação tônica bloqueiam tais respostas (CABIB, 2012; KLOET, 2016; TYE, 2013).

A ativação optogenética tônica dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral aumentaram o comportamento voltado para as tentativas de escape durante o teste de nado forçado (TYE, 2013). Desta forma, uma explicação plausível para o aumento da atividade natatória observado no grupo REMd é que este reflete uma estratégia mal adaptada de lidar com a situação aversiva e inescapável do teste, que é causada por uma hiperativação do sistema mesocorticolímbico.

De modo interessante, um estudo recentemente publicado demonstrou que a privação de sono REM por 72 horas elicitava um estado hiperdopaminérgico com aumento da sensibilidade a novos ambientes e anfetamina (TUAN, 2023). Contudo, estes efeitos da privação de sono sobre o sistema dopaminérgico foram observados 2 horas após o término do período de privação. Assim, se a hiperatividade natatória fosse explicada apenas pelo aumento na atividade dopaminérgica induzido pela privação de sono, os animais do grupo REMd testados em P26 deveriam ser hiperativos também. Além disso, seria esperada uma menor queda de atividade na atividade natatória ao longo dos 5 minutos de teste no grupo de animais privados de sono.

De modo interessante, a privação de sono e as desordens do sono são associadas a alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que levam à desregulação neuroendócrina (HIROTSU, 2015). Várias síndromes clínicas como a insônia, depressão, síndrome de Cushing e apneia do sono envolvem tanto a perturbação do sono como a hiperatividade do (BALBO, 2010). A privação de sono humanos adultos é associada com elevados níveis de cortisol e com uma liberação aumentada de cortisol em resposta ao estresse que são sugestivos de uma hiperatividade do HHA (MINKEL, 2014).

Como o teste de nado livre envolve a exposição do animal a uma situação aversiva e inescapável, é possível que o aumento da atividade natatória observados nos animais submetidos à privação de sono reflita a hiper-reatividade do eixo HHA e o consequente aumento na intensidade dos comportamentos de fuga. Neste sentido, o fato de que a hiperatividade natatória foi observada apenas 10 dias após a privação de sono, é possível que, em indivíduos em idade juvenil, as ações da privação de sono sobre o eixo HHA se manifestem de modo mais tardio do que em indivíduos adultos. Para investigar essa questão é fundamental realizar em uma nova amostra de animais privados de sono durante o período juvenil a dosagem dos níveis séricos de corticosterona após a realização dos testes em P36.

CONCLUSÕES

Neste estudo, testamos a hipótese de que a privação de sono durante o período pré-púbere afeta o comportamento tipo-ansioso e a capacidade de lidar com o estresse. Avaliamos os efeitos imediato e tardio da privação de sono no comportamento tipo-ansioso, através do paradigma do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e a atividade natatória em condições aversivas de desamparo (*helplessness*), através do paradigma do teste de nado forçado.

O LCE realizado imediatamente após a privação de sono indicou uma diminuição nos níveis de ansiedade que não foi observada quando o teste foi realizado 10 dias após a privação de sono. Em contraste, no teste de nado forçado a privação de sono não teve efeito imediato, mas aumentou a atividade natatória 10 dias após a privação de sono. Com base em nesses resultados, podemos concluir que a privação de sono durante o período pré-púbere é capaz de afetar, em curto prazo, o comportamento tipo-ansioso e, em longo prazo, a capacidade de lidar com o estresse.

REFERÊNCIAS

ABEL, E. L. Behavioral and physiological effects of different water depths in the forced swim test. *Physiol Behav.* 1994 Aug;56(2):411-4. doi: 10.1016/0031-9384(94)90215-1. PMID: 7938258.

ABELAIRA, H. M., *et al.* Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Revista Brasileira de Psiquiatria.* 2013.

ABHANG, P.A., GAWALI, B.W., MEHROTRA, S.C. Technological Basics of EEG Recording and Operation of Apparatus, Editor(s): Priyanka A. Abhang, Bharti W. Gawali, Suresh C. Mehrotra, In: Introduction to EEG- and Speech-Based Emotion Recognition, Academic Press, 2016, Pages 19-50, ISBN 9780128044902, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804490-2.00002-6>.

AGOSTINI, A., CENTOFANTI, S. Normal Sleep in Children and Adolescence. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2021 Jan;30(1):1-14. doi: 10.1016/j.chc.2020.08.011. PMID: 33223054.

AHMAD, S.F., BUCKLEY, A.W., GLAZE, D.G. Neurology of Sleep. *Neurol Clin.* 2021 Aug;39(3):867-882. doi: 10.1016/j.ncl.2021.04.007. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34215391.

ALONSO, S.J., CASTELLANO, M.A., AFONSO, D., RODRIGUEZ, M. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. *Physiol Behav.* 1991 Jan;49(1):69-72. doi: 10.1016/0031-9384(91)90232-d. PMID: 2017482.

ANAFI, R.C., KAYSER, M.S., RAIZEN, D.M. Exploring phylogeny to find the function of sleep. *Nat Rev Neurosci.* 2019 Feb;20(2):109-116. doi: 10.1038/s41583-018-0098-9. PMID: 30573905.

ARMARIO, A. The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 128 (2021) 74–86.

ASERINSKY, E., KLEITMAN, N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena during sleep. *Science* 118: 273–274. 1953.

ATROOZ, F., LIU, H., KOCHI, C., SALIM, S. Early Life Sleep Deprivation: Role of Oxidative-Inflammatory Processes. *Neuroscience*. 2019 May 15; 406: 22-37. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.02.021. Epub 2019 Mar 1. PMID: 30826520; PMCID: PMC6511473.

AVILA, J., PERRY, G. Memory, Sleep, and Tau Function. *J Alzheimers Dis*. 2023 May 22. doi: 10.3233/JAD-230230. Epub ahead of print. PMID: 37248906.

BALBO, M., LEPROULT, R., VAN CAUTER, E. Impact of sleep and its disturbances on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity. *International Journal of Endocrinology*, 2010. doi:10.1155/2010/759234

BARF, R. P., MEERLO, P., SCHEURINK, A. J. Chronic sleep disturbance impairs glucose homeostasis in rats. *Int J Endocrinol* 2010; 2010:819414.

BARF, R. P., VAN DIJK, G., SCHEURINK, A. J., HOFFMANN, K., NOVATI, A., HULSHOF, H. J., FUCHS, E., MEERLO, P. Metabolic consequences of chronic sleep restriction in rats: changes in body weight regulation and energy expenditure. *Physiol Behav*. 2012 Oct 10;107(3):322-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.09.005. Epub 2012 Sep 17. PMID: 22995976.

BATHORY, E., TOMOPOULOS, S. Sleep Regulation, Physiology and Development, Sleep Duration and Patterns, and Sleep Hygiene in Infants, Toddlers, and Preschool-Age Children. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2017 Feb;47(2):29-42. doi: 10.1016/j.cppeds.2016.12.001. Epub 2017 Jan 20. PMID: 28117135.

BEAR, M.F., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A. *Neuroscience: Exploring the Brain*. Jones & Bartlett, Edition. 2015.

BELLI, A., BREDI, M., Di MAGGIO, C., ESPOSITO, D., MARCUCCI, L., BRUNI, O. Children with neurodevelopmental disorders: how do they sleep? *Curr Opin Psychiatry*. 2022

Sep 1;35(5):345-351. doi: 10.1097/YCO.0000000000000790. Epub 2022 Feb 15. PMID: 35165244.

BLUMBERG, M.S., SEELKE, A.M., LOWEN, S.B., KARLSSON, K.A. Dynamics of sleep-wake cyclicality in developing rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 11;102(41):14860-4. doi: 10.1073/pnas.0506340102. Epub 2005 Sep 28. PMID: 16192355; PMCID: PMC1253573.

BOGDANOVA, O. V., KANEKAR, S., D'ANCI, K. E., RENSHAW, P. F. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav*. 2013 Jun 13; 118:227-39. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.05.012. Epub 2013 May 14. PMID: 23685235; PMCID: PMC5609482.

BORBELY, A.A., NEUHAUS, H.U. Sleep deprivation: effects on sleep and EEG in the rat. *J. Comp.Physiol.* (1979) 71–87. doi:10.1007/BF00663111

CABIB, S., PUGLISI-ALLEGRA, S. The mesoaccumbens dopamine in coping with stress. *Neurosci Biobehav Rev* 36:79–89. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.04.012>. 2012.

CAMPOS-BELTRÁN, D., MARSHALL, L. Changes in sleep EEG with aging in humans and rodents. *Pflugers Arch*. 2021 May;473(5):841-851. doi: 10.1007/s00424-021-02545-y. Epub 2021 Apr 1. PMID: 33791849; PMCID: PMC8076123.

CAO, J. *et al.* Unraveling why we sleep: Quantitative analysis reveals abrupt transition from neural reorganization to repair in early development. 2020. *Sci. Adv.*6,eaba0398(2020).DOI:10.1126/sciadv.aba0398

CARSKADON, M.A., WOLFSON, A.R., ACEBO, C., TZISCHINSKY, O., SEIFER, R. Adolescent sleep patterns, circadian timing, and sleepiness at a transition to early school days. *Sleep*. 1998 Dec 15;21(8):871-81. doi: 10.1093/sleep/21.8.871. PMID: 9871949.

CHOLERIS, E., THOMAS, A.W., KAVALIERS, M., PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001 May;25(3):235-60. doi: 10.1016/s0149-7634(01)00011-2. PMID: 11378179.

COHEN, H.B., DEMENT, W.C. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of paradoxical phase, *Science* 150 (1965) 1318–1319.

COLAVITO, V., FABENE, P.F., GRASSI-ZUCCONI, G., PIFFERI, F., LAMBERTY, Y., BENTIVOGLIO, M., BERTINI, G. Experimental sleep deprivation as a tool to test memory deficits in rodents. *Front Syst Neurosci.* 2013 Dec 13; 7: 106. doi: 10.3389/fnsys.2013.00106. PMID: 24379759; PMCID: PMC3861693.

COMMONS, K. G., CHOLANIANS, A. B., BABB, J. A., EHLINGER, D. G. The rodent forced swim test measures stress-coping strategy, not depression-like behavior. *ACS Chem Neurosci* 8:955–960. <https://doi.org/10.1021/acchemneu.7b00042>. 2017.

CONKLIN, A.I., YAO, C.A., RICHARDSON, C.G. Chronic sleep deprivation and gender-specific risk of depression in adolescents: a prospective population-based study. *BMC Public Health.* 2018;18(1):724.

CROWLEY, S.J., WOLFSON, A.R., TAROKH, L., CARSKADON, M.A. An update on adolescent sleep: New evidence informing the perfect storm model. *J Adolesc.* 2018 Aug ; 67:55-65. doi: 10.1016/j.adolescence.2018.06.001. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29908393; PMCID: PMC6054480

CRUZ, A.P.M., FREI, F., GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. 1994. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 171-176.

DALVI, A., RODGERS, R.J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1996 Dec;128(4):380-97. doi: 10.1007/s002130050148. PMID: 8986009.

DEMENT, W.C. History of sleep medicine. *Neurol Clin.* 2005 Nov;23(4):945-65, v. doi: 10.1016/j.ncl.2005.07.001. PMID: 16243610.

DIJK, D.J. Slow-wave sleep deficiency and enhancement: Implications for insomnia and its management. 2010. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 11(sup1), 22–28. doi:10.3109/15622971003637645

FERNANDES, C., FILE, S. E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. 1996. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Volume 54, Issue 1, 1996, Pages 31-40, ISSN 0091-3057, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02171-X](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02171-X).

FERNANDEZ, L.M.J., LÜTHI, A. Sleep Spindles: Mechanisms and Functions. *Physiol Rev.* 2020 Apr 1;100(2):805-868. doi: 10.1152/physrev.00042.2018. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31804897.

FILGUEIRAS, C.C., MANHÃES, A.C. Effects of callosal agenesis on rotational side preference of BALB/cCF mice in the free swimming test. *Behav Brain Res.* 2004 Nov 5;155(1):13-25. doi: 10.1016/j.bbr.2004.03.028. PMID: 15325775.

FISHER, S. P. *et al.* Rapid assessment of sleep/wake behaviour in mice, *J Biol Rhythms*, 27(1), pp. 48–58. doi: 10.1177/0748730411431550.Rapid. 2012.

FUTENMA, K., TAKAESU, Y., KOMADA, Y., SHIMURA, A., OKAJIMA, I., MATSUI, K., TANIOKA, K., INOUE, Y. Delayed sleep-wake phase disorder and its related sleep behaviors in the young generation. *Front Psychiatry.* 2023 May 19; 14: 1174719. doi: 10.3389/fpsyt.2023.1174719. PMID: 37275982; PMCID: PMC10235460.

GALVÃO, M. D., SINIGAGLIA-COIMBRA, R., KAWAKAMI, S. E., TUFIK, S., SUCHECKI, D. Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. *Psychoneuroendocrinology* Apr 3 2009;34(8):1176–83. 2009.

GENZEL, L., KROES, M.C., DRESLER, M., BATTAGLIA, F.P. Light sleep versus slow wave sleep in memory consolidation: a question of global versus local processes? *Trends Neurosci.* 2014 Jan;37(1):10-9. doi: 10.1016/j.tins.2013.10.002. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24210928.

GESSA, G. L., PANI, L., FADDA, P., FRATTA, W., 1995. Sleep deprivation in the rat: an animal model of mania. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 5, 89–93. 1995.

GONÇALVES, M.K.R. Efeitos da privação de sono e da exposição precoce ao etanol no comportamento tipo-ansioso de camundongos pré-púberes. Monografia. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, UERJ. 2022.

GRIEBEL, G., PERRAULT, G., SANGER, D.J. CCK receptor antagonists in animal models of anxiety: comparison between exploration tests, conflict procedures and a model based on defensive behaviours. *Behav Pharmacol.* 1997 Nov;8(6-7):549-60. doi: 10.1097/00008877-199711000-00013. PMID: 9832969.

HICKS, R. A., MOORE, J. D., HAYES, C., PHILLIPS, N., HAWKINS, J. REM sleep deprivation increases aggressiveness in male rats. *Physiology & Behavior*, 22(6), 1097–1100. doi:10.1016/0031-9384(79)90263-4. 1979.

HIROTSU, C., TUFIK, S., ANDERSEN, M. L. Interactions between sleep, stress, and metabolism: From physiological to pathological conditions. *Sleep Sci.* 2015 Nov;8(3):143-52. doi: 10.1016/j.slsci.2015.09.002. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26779321; PMCID: PMC4688585.

HUYNH, H. On the reliability of decisions in domain-referenced testing. *Journal of Educational Measurement.* NCME. Volume 13, Issue 4 (253-264). December 1976.

IOANNIDES, A.A., LIU, L., KOSTOPOULOS, G.K. The Emergence of Spindles and K-Complexes and the Role of the Dorsal Caudal Part of the Anterior Cingulate as the Generator of K-Complexes. *Front Neurosci.* 2019 Aug 7; 13: 814. doi: 10.3389/fnins.2019.00814. PMID: 31447635; PMCID: PMC6692490.

JOHNSON, F. K., DELPECH, J. C., THOMPSON, G. J., WEI, L., HAO, J., HERMAN, P., HYDER, F., KAFFMAN, A. Amygdala hyper-connectivity in a mouse model of unpredictable early life stress. *Transl Psychiatry.* 2018 Feb 21;8(1):49. doi: 10.1038/s41398-018-0092-z. PMID: 29463821; PMCID: PMC5820270.

JOUVET, D., VIMONT, E., DELORME, F., JOUVET, M. Étude de la privation sélective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat, *C. R. Soc. Biol.* 158 (1964) 756– 759.

KEENE, A.C., DUBOUE, E.R. The origins and evolution of sleep. *J Exp Biol.* 2018 Jun 12;221(Pt 11):jeb159533. doi: 10.1242/jeb.159533. PMID: 29895581; PMCID: PMC6515771.

KLOET, E. R., MOLENDIJK, M. L. Coping with the forced swim stressor: Towards understanding an adaptive mechanism. *Neural Plast* 2016:1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/6503162>. 2016.

KNUTSON, K. L. O sono inadequado desempenha um papel na vulnerabilidade à obesidade? *Am J Hum Biol*. 24: 361 – 371, 2012.

KOBAN, M., SITA, L.V., LE, W. W., HOFFMAN, G. E. Sleep deprivation of rats: the hyperphagic response is real. *Sleep* Jul 1, 2008;31(7):927–33.

KRAHE, T. E., FILGUEIRAS, C. C., SCHMIDT, S. L. Effects of rotational side preferences on immobile behavior of normal mice in the forced swimming test. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 26:169–176. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(01\)00248-2](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(01)00248-2). 2002.

LECHAT, B., HANSEN, K., MICIC, G., DECUP, F., DUNBAR, C., LIEBICH, T., CATCHESIDE, P., ZAJAMSEK, B. K-complexes are a sensitive marker of noise-related sensory processing during sleep: a pilot study. *Sleep*. 2021 Sep 13;44(9): zsab065. doi: 10.1093/sleep/zsab065. PMID: 33710307.

LEENAARS, C. H. C., VAN DER MIERDEN, S., JOOSTEN, R. N. J. M. A., VAN DER WEIDE, M. A., SCHIRRI, M., DEMATTEIS, M., MEIJBOOM, F. L. B., FEENSTRA, M. G. P., BLEICH, A. Risk-Based Decision Making: A Systematic Scoping Review of Animal Models and a Pilot Study on the Effects of Sleep Deprivation in Rats. *Clocks Sleep*. 2021 Jan 20;3(1):31-52. doi: 10.3390/clockssleep3010003. PMID: 33498259; PMCID: PMC7838799.

LI, W., MA, L., YANG, G., GAN, W.B. REM sleep selectively prunes and maintains new synapses in development and learning. *Nat. Neurosci.* (2017) 20, 427–437.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. 1987. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;92(2):180-5. doi: 10.1007/BF00177912. PMID: 3110839.

LO, C.C., CHOU, T., PENZEL, T., SCAMMELL, T.E., STRECKER, R.E. Common scale-invariant patterns of sleep-wake transitions across mammalian species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:17545–8. [PubMed: 15583127]

LONGORDO, F., KOPP, C., LUTHI, A. Consequences of sleep deprivation on neurotransmitter receptor expression and function. *Eur. J. Neurosci.* (2009) 29, 1810–1819. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06719.x

MACHADO, R.B., HIPÓLIDE, D.C., BENEDITO-SILVA, A.A., TUFIK, S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res.* 2004 Apr 9;1004(1-2):45-51. doi: 10.1016/j.brainres.2004.01.019. PMID: 15033418.

MACNISH, R. *The philosophy of sleep.* New York: Appleton; 1834.

MALLICK, B.N., SINGH, S. SINGH, A. Mechanism of noradrenaline-induced stimulation of Na–K ATPase activity in the rat brain: implications on REM sleep deprivation-induced increase in brain excitability. 2010. *Mol Cell Biochem* 336, 3–16 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0260-9>.

MANHÃES, A.C., ABREU-VILLAÇA, Y., SCHMIDT, S.L., FILGUEIRAS, C.C. Neonatal transection of the corpus callosum affects rotational side preference in adult Swiss mice. *Neurosci Lett.* 2007 Mar 26;415(2):159-63. doi: 10.1016/j.neulet.2007.01.012. Epub 2007 Jan 10. PMID: 17303334.

MANHÃES, A.C., SCHMIDT, S. L., FILGUEIRAS, C. C. Callosal agenesis affects consistency of laterality in a paw preference task in BALB/cCF mice. 2005. *Behavioural Brain Research*, 159(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.09.023>

MARIANO, K. A. A. Efeito do bloqueio dos receptores mineralocorticóides da região infra-límbica do córtex pré-frontal medial sobre a tolerância aos efeitos do Midazolam em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado. 2017. *Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP.* 2017.

MARQUES, R. G. *et al.* Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir.Bras.* 24: 69-74, 2009.

MEDINA, E., SCHOCH, H., FORD, K., WINTLER, T., SINGLETARY, K.G., PEIXOTO, L. Shank3 influences mammalian sleep development. *J Neurosci Res.* 2022 Dec;100(12):2174-2186. doi: 10.1002/jnr.25119. Epub 2022 Sep 2. PMID: 36056598; PMCID: PMC9588578.

MELTZER, L.J., MINDELL, J. A. Sleep and Sleep Disorders in Children and Adolescents. 2006. *Psychiatric Clinics of North America*, Volume 29, Issue 4, 2006, Pages 1059-1076, ISSN 0193-953X, <https://doi.org/10.1016/j.psc.2006.08.004>.

MILMAN, N. E. P., TINSLEY, C. E., RAJU, R. M., LIM, M. M. Loss of sleep when it is needed most - Consequences of persistent developmental sleep disruption: A scoping review of rodent models. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms.* 2022 Dec 6; 14: 100085. doi: 10.1016/j.nbscr.2022.100085. PMID: 36567958; PMCID: PMC9768382.

MINKEL, J., MORETA, M., MUTO, J., HTAIK, O., JONES, C., BASNER, M., DINGES, D. Sleep deprivation potentiates HPA axis stress reactivity in healthy adults. *Health Psychol.* 2014 Nov;33(11):1430-4. doi: 10.1037/a0034219. Epub 2014 May 12. PMID: 24818608.

MIYAMOTO, H., KATAGIRI, H., HENSCH, T. Experience-dependent slow-wave sleep development. 2003. *Nat Neurosci.* 2003;6:553–554.

MIYAZAKI, S., LIU, C.Y., HAYASHI, Y. Sleep in vertebrate and invertebrate animals, and insights into the function and evolution of sleep. *Neurosci Res.* 2017 May; 118:3-12. doi: 10.1016/j.neures.2017.04.017. Epub 2017 May 10. PMID: 28501499.

MOURA, E. G., LISBOA, P. C., PASSOS, M. C. F. Neonatal programming of neuroimmunomodulation - Role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation* 15, 176–188, 2008.

MURACK, M., CHANDRASEGARAM, R., SMITH, K.B., AH-YEN, E.G., RHEAUME, É., MALETTE-GUYON, É., NANJI, Z., SEMCHISHEN, S.N., LATUS, O., MESSIER, C., ISMAIL, N. Chronic sleep disruption induces depression-like behavior in adolescent male and female mice and sensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adolescent female mice. *Behav Brain Res.* 2021 Feb 5;399:113001. doi: 10.1016/j.bbr.2020.113001. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33197456.

OJIO, Y., NISHIDA, A., SHIMODERA, S., TOGO, F., SASAKI, T. Sleep Duration Associated with the Lowest Risk of Depression/Anxiety in Adolescents. *Sleep*. 2016 Aug 1;39(8):1555-62. doi: 10.5665/sleep.6020. PMID: 27306271; PMCID: PMC4945315.

OLIVEIRA, E. M., VISNIAUSKAS, B., SANDRI, S., MIGLIORINI, S., ANDERSEN, M. L., TUFIK, S., FOCK, R. A., CHAGAS, J. R., CAMPA, A. Late effects of sleep restriction: Potentiating weight gain and insulin resistance arising from a high-fat diet in mice. *Obesity (Silver Spring)*. E pub 2014 Dec 31, 23(2): 391-8, Feb 2015.

PACK, A.I., GALANTE, R.J., MAISLIN, G., CATER, J., METAXAS, D. Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice. *Physiol Genomics*. 2007; 28:232–8. [PubMed: 16985007]

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: How are females different? 2001. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(3), 219–233. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00010-0).

PEEVER, J., FULLER, P.M. The Biology of REM Sleep. *Curr Biol*. 2017 Nov 20;27(22):R1237-R1248. doi: 10.1016/j.cub.2017.10.026. PMID: 29161567.

PIÉRARD, C., LISCIA, P., PHILIPPIN, J.N., MONS, N., LAFON, T., CHAUVEAU, F., VAN BEERS, P., DROUET, I., SERRA, A., JOUANIN, J.C., BÉRACOCHEA, D. Modafinil restores memory performance and neural activity impaired by sleep deprivation in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 Nov;88(1):55-63. doi: 10.1016/j.pbb.2007.07.006. Epub 2007 Jul 20. PMID: 17698177.

PORSOLT, R. D., ANTON, G., BLAVET, N., JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 1978 Feb 15;47(4):379-91. doi: 10.1016/0014-2999(78)90118-8. PMID: 204499.

PORSOLT, R. D., *et al.* Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. 1977. *Nature*, Vol. 266: 730-732, April, 21 of 1977.

PORSOLT, R.D. "Sudden death" in laboratory rats: Animal model of depression? *Drug Development Research*, Vol 1, Issue 3 (229-233). 1981.

RANA, M., RIFFO-ALLENDE, C., MESA-LATORRE, T., ROSSO-ASTORGA, K., TORRES, A.R. Sueño en los niños: fisiología y actualización de los últimos conocimientos [Sleep in children: physiology and update of a literature review]. *Medicina (B Aires)*. 2019;79 Suppl 3:25-28. Spanish. PMID: 31603839.

RECHTSCHAFFEN, A., BERGMANN, B. M. Sleep deprivation in the rat by the disk-overwater method. *Behav Brain Res* Jul 1995;69(1-2):55-63.

REVEL F. G., GOTTOWIK J., GATTI S., WETTSTEIN J. G., MOREAU J. L. Rodent models of insomnia: A review of experimental procedures that induce sleep disturbances. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33 (2009) 874-899.

RIBEIRO, S., GOYAL, V., MELLO, C.V., PAVLIDES, C. Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learn Mem.* 1999 Sep-Oct;6(5):500-8. doi: 10.1101/lm.6.5.500. PMID: 10541470; PMCID: PMC311304.

RICHARDSON, G. S. Human physiological models of insomnia. *Sleep Med.* 2007 Dec;8 Suppl 4: S9-14. doi: 10.1016/S1389-9457(08)70003-0. PMID: 18346677. 2007.

ROCHA-LOPES, J. S., MACHADO, R. B., SUCHECKI, D. Chronic REM Sleep Restriction in Juvenile Male Rats Induces Anxiety-Like Behavior and Alters Monoamine Systems in the Amygdala and Hippocampus. *Mol Neurobiol.* 2018 Apr;55(4):2884-2896. doi: 10.1007/s12035-017-0541-3. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28455701.

RODGERS, R. J. Animal models of "anxiety": Where next? 1997. *Behavioural Pharmacology*, 8(6-7), 477-496. <https://doi.org/10.1097/00008877-199711000-00003>

ROSAS-SÁNCHEZ, G. U., GERMAN-PONCIANO, L. J., RODRÍGUEZ-LANDA, J. F. Considerations of Pool Dimensions in the Forced Swim Test in Predicting the Potential Antidepressant Activity of Drugs. *Front Behav Neurosci.* 2022 Jan 7; 15: 757348. doi: 10.3389/fnbeh.2021.757348. PMID: 35069137; PMCID: PMC8777187.

SADLER, A. M., BAILEY, S. J. Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. *Physiol Behav.* 2016 Dec 1; 167: 313-323. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.09.014. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27647655.

SANTOS, C.C. Efeitos da privação de sono e da exposição precoce ao etanol no comportamento em campo aberto de camundongos pré-púberes. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2021.

SARE, R.M., *et al.* Chronic sleep restriction during development can lead to long-lasting behavioral effects. *Physiol Behav*, 2016. 155: p. 208-17.

SCHLIEBER, M., HAN, J. The Role of Sleep in Young Children's Development: A Review. *J Genet Psychol.* 2021 Jul-Aug;182(4):205-217. doi: 10.1080/00221325.2021.1908218. Epub 2021 Apr 7. PMID: 33825621.

SCHMIDT, S. L., FILGUEIRAS, C. C., KRAHE, T. E. Effects of sex and laterality on the rotatory swimming behavior of normal mice. *Physiol Behav* 65:607–616. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00184-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00184-X). 1999.

SCHULZ, H. The history of sleep research and sleep medicine in Europe. *J Sleep Res.* 2022 Aug;31(4): e13602. doi: 10.1111/jsr.13602. Epub 2022 May 6. PMID: 35522132.

SCHWARZ, J., AXELSSON, J., GERHARDSSON, A., TAMM, S., FISCHER, H., KECKLUND, G., ÅKERSTEDT, T. Mood impairment is stronger in young than in older adults after sleep deprivation. *J Sleep Res.* 2018.e12801.

SEELKE, A.M., BLUMBERG, M.S. The microstructure of active and quiet sleep as cortical delta activity emerges in infant rats. *Sleep.* 2008 May;31(5):691-9. doi: 10.1093/sleep/31.5.691. PMID: 18517038; PMCID: PMC2398759.

SHINOMIYA, K., SHIGEMOTO, Y., OKUMA, C., MIO, M., KAMEI, C. Effects of short-acting hypnotics on sleep latency in rats placed on grid suspended over water. *Eur.J.Pharmacol.* (2003) 460, 139–144.doi:10.1016/S0014-2999(02)02915-1

SIMIONATO, N. M., ROCHA-LOPES, J. S., MACHADO, R. B., SUCHECKI, D. Chronic rapid eye movement sleep restriction during juvenility has long-term effects on anxiety-like behaviour and neurotransmission of male Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2022 Jun; 217: 173410. doi: 10.1016/j.pbb.2022.173410. Epub 2022 Jun 2.

SUCHECKI, D., DUARTE-PALMA, B., TUFIK, S., 2000. Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method. *Brain Res.* 875, 14–22. 2000.

SUCHECKI, D., TUFIK, S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for PS deprivation in the rat, *Physiol. Behav.* 68 (2000) 309–316.

THORPE, K., STATON, S., SAWYER, E., PATTINSON, C., HADEN, C., SMITH, S. Napping, development and health from 0 to 5 years: a systematic review. *Arch Dis Child.* 2015 Jul;100(7):615-22. doi: 10.1136/archdischild-2014-307241. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25691291.

THORPHY, M.J. History of sleep medicine. *Handb Clin Neurol.* 2011; 98:3-25. doi: 10.1016/B978-0-444-52006-7.00001-0. PMID: 21056176.

TUAN, L. H., YEH, J. W., LEE, L. J., LEE, L. J. Sleep Deprivation Induces Dopamine System Maladaptation and Escalated Corticotrophin-Releasing Factor Signaling in Adolescent Mice. *Mol Neurobiol.* 2023 Jun;60(6):3190-3209. doi: 10.1007/s12035-023-03258-2. Epub 2023 Feb 23. PMID: 36813955.

TYE, K. M., MIRZABEKOV, J. J., WARDEN, M. R. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* 493:537–541. <https://doi.org/10.1038/nature11740>. 2013.

VOGEL, W.H. Pharmacology of methylated norepinephrine derivatives. 1975. *Psychopharmacol Bull.* 1975 Jul;11(3):72-3. PMID: 1098089.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998 Jul;42(1):13-28. doi: 10.1093/jac/42.1.13. PMID: 9700525.

WALF, A. A., FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322-8. doi: 10.1038/nprot.2007.44. PMID: 17406592; PMCID: PMC3623971.

WALKER, M.P. 2008. The role of sleep in cognition and emotion. *Ann NY Acad Sci* 1156:168–197.

WEAVER, M.D., BARGER, L.K., MALONE, S.K., ANDERSON, L.S., KLERMAN, E.B. Dose-Dependent Associations Between Sleep Duration and Unsafe Behaviors Among US High School Students. *JAMA Pediatr.* 2018 Dec 1;172(12):1187-1189. doi: 10.1001/jamapediatrics.2018.2777. PMID: 30285029; PMCID: PMC6366445.

WEIERGRABER, M., HENRY, M., HESCHELER, J., SMYTH, N., SCHNEIDER, T. Electrocorticographic and deep intracerebral EEG recording in mice using a telemetry system. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2005; 14:154–64. [PubMed: 15795169]

WEISMAN, O., MAGORI-COHEN, R., LOUZOUN, Y., EIDELMAN, A.I., FELDMAN, R. Sleepwake transitions in premature neonates predict early development. *Pediatrics* (2011) 128,706–714.

WEST, C.A., REID, K.H., SCHURR, A. A simple rapid swim test to determine spatial preference in the rat. *Physiol Behav.* 1986; 36(2):393-5. doi: 10.1016/0031-9384(86)90035-1. PMID: 3961017.

WILLNER, P. Animal models of depression: an overview. *Pharmac Ther.* 1990;45:425–455.

WOLFSON, A.R., CARSKADON, M.A. Sleep schedules and daytime functioning in adolescents. *Child Dev.* 1998 Aug;69(4):875-87. PMID: 9768476.

WOMACK, S. D., HOOK, J. N., REYNA, S. H., RAMOS, M. Sleep loss and risk-taking behavior: a review of the literature. *Behav Sleep Med.* 2013;11(5):343-59. doi: 10.1080/15402002.2012.703628. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23286526.

YAMAZAKI, R., TODA, H., LIBOUREL, P.A., HAYASHI, Y., VOGT, K.E., SAKURAI, T. Evolutionary Origin of Distinct NREM and REM Sleep. *Front Psychol.* 2020 Dec 14; 11 : 567618. doi: 10.3389/fpsyg.2020.567618. PMID: 33381062; PMCID: PMC7767968.

YASENKOV, R., DEBOER, T. Circadian modulation of sleep in rodents. *Prog Brain Res.* 2012; 199: 203-218. doi: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00012-5. PMID: 22877667.