

Lia Assae Esumi

**Avaliação da participação de mediadores
inflamatórios no prejuízo de memória em ratos
privados de sono**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo

2010

Lia Assae Esumi

**Avaliação da participação de mediadores
inflamatórios no prejuízo de memória em ratos
privados de sono**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora Cristina Hipólide

Co-orientadora: Dr^a. Beatriz Duarte Palma Xylaras

São Paulo

2010

Esumi, Lia Assae

Avaliação da participação de mediadores inflamatórios no prejuízo de memória em ratos privados de sono / Lia Assae Esumi. --São Paulo, 2010.

xi, 68p.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Evaluation of inflammatory markers involvement on memory deficit of sleep deprived rats.

1. Sono. 2. Citocinas. 3. Memória. 4. Peso corporal. 5. Interleucina-6.

Lia Assae Esumi

Título: Avaliação da participação de mediadores inflamatórios no prejuízo de memória
em ratos privados de sono

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso

Prof^a. Dr^a. Vânia D'Almeida

Prof^a. Dr^a. Tatiana Lima Ferreira

Prof^a. Dr^a. Paula Ayako Tiba (Suplente)

Aprovada em:

20 de dezembro de 2010

Universidade Federal de São Paulo

Escola Paulista de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

Chefe do Departamento de Psicobiologia

Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Oliveira de Souza Formigoni

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

AGRADECIMENTOS

Foi mais difícil escrever esta página de agradecimentos do que escrever a tese inteira. Perdi as contas de quantas vezes escrevi e, logo em seguida, apaguei tudo. O motivo disso é a minha imensa gratidão a todos vocês: nada que eu escrever aqui vai chegar aos pés do que vocês realmente merecem. Muito obrigada por tudo!

Débora e Bia – Orientadoras exemplares, amigas queridas, e por muitas vezes “mãezonas” carinhosas e compreensivas. Obrigada pela oportunidade e por todas as portas abertas por vocês.

Van – Amiga, mais uma etapa cumprida! Nada disso teria começado, acontecido, e terminado tão bem sem você. Obrigada por todo apoio, e, principalmente, pela preciosa amizade.

Juju, Vivi, e Cadu – Para terminar uma tese não é só necessário muito estudo, esforço, e dedicação. É preciso também de muita risada, um ombro amigo para os momentos difíceis, conselhos valiosos, e muito bolo com café.

Sizue, minha mãe – Obrigada pelo apoio em todas as minhas escolhas, pelo carinho, e pela paciência.

João Pedro – Se são nos momentos difíceis que se encontra um verdadeiro amigo, então você será meu amigo para toda a vida. Obrigada pelo apoio, incentivo e admiração.

Aos demais colegas de departamento (professores, alunos, técnicos, e funcionários) que me ajudaram neste trabalho – Nestes dois anos percebi que nunca estarei sozinha. Sempre vou poder contar com alguém para me ajudar, sanar minhas dúvidas, ou me socorrer quando estiver em apuros em algum experimento. Aprendi muito com todos vocês. Muito obrigada a todos.

Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com o apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 08/51656-5).

Anybody who has been seriously engaged in scientific work of any kind realizes that over the entrance to the gates of the temple of science are written the words: 'We must have faith'.

Max Planck

RESUMO

Estudos demonstram que a privação de sono (PS) provoca alterações cognitivas, como o prejuízo de memória. A PS pode ainda alterar a concentração de mediadores inflamatórios, como por exemplo as citocinas, que, por sua vez, estão relacionadas ao funcionamento cognitivo. Apesar das evidências, a relação das citocinas com este efeito da PS ainda precisa ser esclarecida. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo estudar o envolvimento destes mediadores inflamatórios no prejuízo de memória de ratos privados de sono. Ratos machos *Wistar* de 3 meses de idade foram privados de sono pelo método das plataformas múltiplas modificado durante 96 horas, enquanto que seus respectivos controles permaneceram nas gaiolas-moradia. Para a avaliação de memória após a PS, todos os animais foram submetidos ao treino, e, 24 horas depois, ao teste da tarefa de esquiva inibitória. O peso dos animais foi registrado diariamente. No primeiro experimento os animais receberam uma administração aguda de lipopolissacarídeo (LPS) nas doses 50 ou 75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (i.p.), 3 horas antes do treino de esquiva inibitória, para induzir a produção de mediadores inflamatórios. Dadas as evidências do envolvimento da citocina interleucina-6 (IL-6) nos efeitos da PS, realizou-se também o bloqueio agudo e crônico desta citocina através da administração de um anticorpo (Ac) anti-IL-6 na dose 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (i.p.). A administração aguda também ocorreu 3 horas antes do treino de esquiva inibitória, enquanto que no tratamento crônico as administrações foram realizadas em todos os dias do período de PS. No tratamento com LPS, apenas a dose de 75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ resultou em um efeito significativo nas avaliações de memória: houve

atenuação do prejuízo de memória dos animais privados de sono. Com relação ao peso corporal observou-se que o LPS reduziu significativamente o peso dos grupos controle e privado de sono 24 horas após a administração. Nos tratamentos com o Ac anti-IL-6, não foram observadas alterações no desempenho cognitivo, no entanto, o Ac atenuou a perda de peso nos animais privados de sono. Dessa maneira, os resultados sugerem o envolvimento de mediadores inflamatórios na modulação do prejuízo de memória e redução de peso observados em ratos privados de sono.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS (v)	
RESUMO (viii)	
1 INTRODUÇÃO (1)	
1.1 Qual a função do sono? (1)	
1.2 Sono e memória (2)	
1.3 Sistema imunológico e sistema nervoso (7)	
1.3.1 <i>Citocinas e regulação do sono (13)</i>	
1.4 Citocinas e cognição (17)	
2 JUSTIFICATIVA (20)	
3 OBJETIVO (22)	
4 MATERIAIS E MÉTODOS (23)	
4.1 Animais (23)	
4.2 Habituação à manipulação e medição de peso (23)	
4.3 Privação de sono (24)	
4.4 Tarefa de esquiva inibitória (25)	
4.5 Drogas (28)	
4.5.1 <i>Lipopolissacarídeo (LPS) (28)</i>	
4.5.2 <i>Anticorpo anti-IL-6 (29)</i>	
4.6 Análise estatística (30)	
4.7 Delineamento experimental (30)	

- 4.7.1** *Experimento 1: Efeitos do LPS sobre o desempenho na tarefa de esquiva inibitória (30)*
- 4.7.2** *Experimento 2: Efeitos do bloqueio da IL-6 sobre o desempenho na tarefa de esquiva inibitória (32)*
- 5 RESULTADOS (34)**
 - 5.1** Experimento 1: Efeitos do LPS sobre o desempenho na tarefa de esquiva inibitória (34)
 - 5.1.1** *Tarefa de esquiva inibitória (34)*
 - 5.1.2** *Peso corporal (36)*
 - 5.2** Experimento 2: Efeitos do bloqueio da IL-6 sobre o desempenho na tarefa de esquiva inibitória (38)
 - 5.2.1** *Tarefa de esquiva inibitória (38)*
 - 5.2.2** *Peso corporal (40)*
- 6 DISCUSSÃO (42)**
- 7 CONCLUSÕES (49)**
- 8 REFERÊNCIAS (50)**

1 | INTRODUÇÃO

1.1 | Qual a função do sono?

O sono é um fenômeno que há muito tempo instiga a curiosidade humana. Os primeiros registros científicos sobre o sono surgiram na Grécia antiga, elaborados a partir de observações de Sócrates, Platão, e Aristóteles. Desde então, apesar dos inúmeros estudos, a principal questão sobre este fenômeno ainda permanece sem resposta: qual é a função do sono? Na tentativa de esclarecer tal questão, pesquisadores utilizam a privação de sono como “ferramenta”, pois os efeitos da ausência do sono dão pistas sobre sua função. O primeiro estudo experimental sobre privação de sono, executado por Marie De Manacéine, foi apresentado no Congresso Internacional de Medicina, realizado em Roma no ano de 1894. Neste estudo, dez filhotes de cães de dois a quatro meses de idade foram mantidos acordados em atividade constante, e alimentados por suas respectivas mães. Ao final do experimento, De Manacéine concluiu que *“a total ausência de sono é, para os animais, mais fatal que a total ausência de comida”*, já que os cães sobreviviam à cerca de 25 dias de inanição, enquanto que a privação de sono acima de 96 horas já se mostrava fatal (De Manacéine, 1894). Posteriormente, além da constatação de que o sono é essencial para a sobrevivência, muitos outros efeitos da privação de sono foram evidenciados em estudos com modelos animais. Por exemplo, já foram relatadas alterações na temperatura corporal (Landis *et al.*, 1992; Rechtschaffen & Bergmann,

2002), redução de peso (Koban & Swinson, 2005; Hipólide *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008), alterações endócrinas (Spiegel *et al.*, 1999; Andersen *et al.*, 2005), alterações imunológicas (Irwin, 2002; Bryant *et al.*, 2004) e prejuízo de memória (Bueno *et al.*, 1994; Smith & Rose, 1996; Dametto *et al.*, 2002; Graves *et al.*, 2003), indicando uma possível relação do sono com estas funções.

1.2| Sono e memória

Dentre as prováveis funções já atribuídas ao sono, destaca-se a hipótese de que este fenômeno participa da consolidação de memórias. A consolidação se refere ao processamento de traços de memória, durante o qual os traços são reativados, analisados e gradualmente incorporados à memória de longa duração (Sutherland & McNaughton, 2000).

Com relação aos humanos, relata-se mais de um tipo de memória. Considere, por exemplo, a capital do Brasil, o que você comeu no último jantar, e como andar de bicicleta. Estas três recordações requerem informações aprendidas e armazenadas, mas são tipos de memória muito diferentes. Múltiplos sistemas de memória armazenam diferentes classes de memória em diferentes regiões cerebrais e, muito provavelmente, em diferentes formatos. As memórias são comumente divididas em declarativas, que são aquelas que o indivíduo evoca ativamente (por exemplo, a capital do Brasil ou o

que comeu no último jantar), e memórias não declarativas, que normalmente são utilizadas sem a evocação consciente (por exemplo, como andar de bicicleta) (Stickgold, 2005). Para animais, normalmente não se utiliza a classificação de memórias por tipo de informação. O que geralmente se observa é a classificação de acordo com a estrutura cerebral da qual depende, como, por exemplo, o hipocampo, estriado, e a amígdala (White & McDonald, 2002).

Até o momento, nenhum estudo definitivamente provou a hipótese de que o sono participa da consolidação de memórias, porém, um grande número de evidências sustenta esta idéia. Uma delas é a alteração da arquitetura do sono que ocorre após o treino de uma tarefa de memória. O sono é basicamente dividido em dois estágios: o sono NREM (não-REM, ou sono de ondas lentas, no caso de ratos e camundongos), e o sono REM (*rapid eye movement*, ou sono paradoxal, para ratos e camundongos). Em humanos, após uma tarefa de memória, observa-se aumento do sono REM (De Koninck *et al.*, 1989; Mandai *et al.*, 1989), e do mesmo modo, em animais (principalmente roedores), o treino de várias tarefas é seguido por aumento do sono paradoxal (Lucero, 1970; Hennevin *et al.*, 1995). O aumento de sono paradoxal parece estar estritamente relacionado ao processo de aprendizado: o sono retorna ao normal à medida que os animais resolvem a tarefa, e não há aumento de sono paradoxal se não há aprendizado (Hennevin & Leconte, 1977; Smith *et al.*, 1980). Outros estudos exploram ainda a hipótese de que o processo de consolidação de memórias depende da reorganização de sistemas de memórias individuais, e também de mecanismos celulares e moleculares que ocorrem localmente nas sinapses (Dudai, 2004). Observa-se em muitos estudos que a atividade neuronal expressa durante o período de vigília

parece ser restabelecida, ou reativada, durante o sono. Sugere-se que estas reativações permitem o fortalecimento de conexões intercelulares entre elementos da rede, e a incorporação da nova experiência à memória de longo prazo (Maquet, 2001). Já foi demonstrado em ratos que os padrões espaço-temporais de disparos neuronais que ocorrem no hipocampo durante a exploração de um novo ambiente, ou em uma simples tarefa espacial, são reativados na mesma ordem durante o sono de ondas lentas (Wilson & McNaughton, 1994). Resultados similares também foram observados em humanos através de estudos de neuroimagem (Peigneux *et al.*, 2004). Como dito anteriormente, o processo de consolidação envolve também o fortalecimento de sinapses (Dudai, 2004). Dados indicam que o fenômeno da potenciação de longa duração (*long-term potentiation*, LTP) é o principal mecanismo envolvido na consolidação sináptica, que ocorre preferencialmente durante o sono REM, embora ela esteja relacionada às reativações de sistemas que ocorrem durante o sono de ondas lentas anterior. Dessa maneira, em resumo, sugere-se que o sono de ondas lentas auxilia na reativação das memórias recentes (consolidação de sistemas), e assim, permite a indução da LTP para a consolidação sináptica de redes relevantes durante o sono REM (Diekelmann & Born, 2010).

Entre os paradigmas utilizados para o estudo da relação entre sono e memória, existe ainda a privação de sono, que já proporcionou muitos resultados favoráveis a esta hipótese. Já foi demonstrado que a privação de sono prejudica o desempenho de humanos em diversas tarefas de memória (Stickgold, 2005). Trabalhos com modelos animais, por sua vez, conduzem à importância do sono para a consolidação de memórias dependentes da função hipocampal. Bueno e colaboradores (1994)

mostraram que ratos submetidos a privação de sono paradoxal durante 96 horas apresentam prejuízo na aquisição da tarefa de esquiva inibitória (tarefa dependente de hipocampo), porém nenhum efeito foi observado no condicionamento clássico de medo (tarefa não-dependente de hipocampo). Resultado semelhante foi obtido por Smith e Rose (1996), com a utilização das versões espacial (dependente de hipocampo) e não espacial (não-dependente de hipocampo) do labirinto aquático de Morris, e por Graves e colaboradores (2003), com a utilização do condicionamento de medo ao contexto (dependente de hipocampo) e ao som (não-dependente de hipocampo). Até o momento, os mecanismos envolvidos neste prejuízo de memória ainda não foram esclarecidos, porém, muitas hipóteses já foram propostas e investigadas. Muitos estudos conduzidos em nosso departamento já investigaram, por exemplo, o envolvimento de alterações em sistemas de neurotransmissores. Bueno e colaboradores (2000) demonstraram o envolvimento do sistema colinérgico no prejuízo de memória de ratos privados de sono, já que o tratamento com pilocarpina (agonista colinérgico) preveniu o déficit cognitivo. Posteriormente, Moreira e colaboradores (2003) investigaram, através da técnica de autorradiografia, os efeitos da privação de sono no *binding* de receptores M1 (muscarínico 1), porém, não houve alteração. Os autores sugerem que outros tipos de alterações no sistema colinérgico podem ser responsáveis pelo prejuízo de memória. O sistema GABAérgico também foi alvo de investigação. Dubiela e colaboradores (2005) analisaram o *binding* de receptores benzodiazepínicos e GABA_A após a privação de sono, e não foi observada alteração. Posteriormente, os autores, além de realizarem o tratamento dos animais privados de sono com β -CCM (agonista benzodiazepínico inverso), avaliaram também o *binding* no sítio de ligação desta droga. O tratamento com β -CCM não preveniu o prejuízo de

memória dos animais privados de sono, porém, observou-se diminuição do *binding* no córtex entorrinal, área relacionada à formação de memórias emocionais (Dubiela *et al.*, 2010). Além da alteração de neurotransmissores, evidências indicavam ainda que a liberação de glicocorticóides resultante do estresse, fator inerente à privação de sono, poderia ser a origem do prejuízo de memória, já que concentrações elevadas de corticosterona prejudicam o processo de consolidação (Korte, 2001). Porém, Tiba e colaboradores (2008) demonstraram que o aumento de corticosterona nos animais privados de sono não é responsável pelo prejuízo de memória, já que o tratamento com metirapona (inibidor da síntese de corticosterona) não preveniu o déficit cognitivo. Outro fator também já investigado foi o estresse oxidativo: Silva e colaboradores (2004) observaram que, após a privação de sono, havia aumento do estresse oxidativo no hipocampo de camundongos. O tratamento destes animais com agente antioxidantes (melatonina, vitamina E, e N-terc-butil-a-fenil nitrona) preveniu o prejuízo de memória, indicando o possível envolvimento do estresse oxidativo no declínio cognitivo resultante da privação de sono.

Recentemente, porém, uma nova linha de pesquisa adicionou outra possibilidade dentre as hipóteses sobre os mecanismos envolvidos no prejuízo de memória resultante da privação de sono: são os estudos sobre a relação entre sistema imunológico e funcionamento cognitivo.

1.3| Sistema imunológico e sistema nervoso

Antes de começar a discorrer sobre a influência do sistema imunológico na função cognitiva, é necessário ressaltar algumas características da relação entre o sistema imunológico e o sistema nervoso. O sistema imunológico é convencionalmente descrito como um sistema de defesa do organismo, delineado para discriminar o “próprio” do “não próprio”. Elementos funcionais do sistema imunológico incluem diversos tipos de células, tecidos, proteínas séricas, e pequenos peptídeos, como as quimiocinas e citocinas. Todos estes componentes, por sua vez, interagem entre si e com outros diversos elementos do organismo (Gorczynski & Stanley, 1999). A cada dia, porém, outras funções não imunológicas são descritas para determinados componentes do sistema imunológico, e neste contexto se inserem algumas funções relacionadas ao sistema nervoso central.

Inicialmente, o cérebro era visto como um órgão sequestrado, protegido e isolado do resto do organismo. Porém, sabe-se hoje que este órgão é imunologicamente ativo e está em comunicação direta com o sistema imunológico. Basicamente duas vias ligam o sistema imunológico ao cérebro: o sistema nervoso autônomo e o sistema endócrino. As moléculas liberadas por estes sistemas são reconhecidas pelo sistema imunológico através de receptores de membrana específicos. O caminho inverso também ocorre: a ativação do sistema imunológico é acompanhada por alterações endócrinas e também de funções nervosas, que, por sua vez, podem alterar o comportamento (Glaser *et al.*, 1987). Um exemplo clássico da

comunicação entre os sistemas nervoso e imunológico é facilmente identificado em nosso dia-a-dia: pessoas doentes, devido a uma infecção, geralmente se sentem febris e nauseadas, ignoram comida e bebidas, e perdem o interesse por seu ambiente físico e social. Elas também se cansam facilmente, e o sono é geralmente comprometido. Além disso, estas pessoas se sentem depressivas e irritadas, e podem exibir alterações cognitivas leves, que podem ir de um prejuízo de atenção a até dificuldades em recordar eventos recentes. Estas alterações, conjuntamente denominadas de comportamento doentio (*sickness behavior*), são causadas por mediadores imunológicos produzidos em resposta à infecção e que atuam no sistema nervoso central alterando o comportamento. Tais mediadores são as citocinas, sendo as mais conhecidas e estudadas a interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Dantzer *et al.*, 2008). O comportamento doentio também pode ser eliciado apenas por endotoxinas, componentes da parede de bactérias, como o lipopolissacarídeo (LPS). O LPS estimula os macrófagos a secretarem as citocinas IL-1 β , IL-6, e TNF- α , que por sua vez irão mediar os efeitos induzidos pelo LPS (Connor & Leonard, 1998).

As citocinas são importantes moléculas orquestradoras de diversas funções do organismo. Elas regulam funções celulares, como proliferação, sobrevivência e maturação, e são essenciais para o desenvolvimento e funcionamento dos sistemas nervoso e hematopoiético. As citocinas são geralmente produzidas por leucócitos, principalmente linfócitos e monócitos, porém, muitas também são produzidas por outras células somáticas. As citocinas são agentes poderosos e sua ação prolongada no organismo pode ser danosa. Dessa maneira, estas moléculas são geralmente

produzidas apenas em resposta a estímulos apropriados e somente em intervalos relativamente curtos de tempo. Na célula-alvo, as citocinas se ligam a receptores de membrana específicos, e esta ação geralmente é seguida pela ativação de determinadas cascatas de sinalização intracelulares. Por sua vez, o desencadeamento destas cascatas gera a ativação ou silenciamento de genes-alvo específicos (Ransohoff & Benveniste, 2006).

A principal característica da ação das citocinas é o pleiotropismo, isto é, uma única citocina pode atuar sobre muitas células-alvo e eliciar diversas respostas (Ransohoff & Benveniste, 2006). Devido a esta característica, é difícil indicar as ações de uma determinada citocina, e a especificidade da resposta fica por conta da presença de receptores de membrana específicos (Wilson *et al.*, 2002). A ação das citocinas muitas vezes é também redundante: diferentes citocinas eliciam o mesmo efeito biológico ou efeito similar. Devido à redundância, a eliminação ou bloqueio de uma determinada citocina pode não resultar em um grande impacto, já que outras citocinas podem compensar sua ausência. Outra característica da ação de muitas destas moléculas é a propensão a atuar sinergicamente ou antagonicamente com outras citocinas. Assim, muitas ações são indiretas, isto é, ocorrem devido ao aumento ou redução da produção de outras citocinas, que por sua vez resultam no efeito biológico. Dessa maneira, as células e tecidos raramente (ou nunca) entram em contato com uma única citocina em um determinado momento. Ao contrário, as células geralmente estão expostas a um coquetel de diversos destes mediadores, com a ação biológica resultante refletindo várias interações sinérgicas e antagônicas das citocinas presentes (Ransohoff & Benveniste, 2006).

Existem basicamente duas vias pelas quais as citocinas produzidas periféricamente podem se comunicar com o sistema nervoso central: a via humoral e a via nervosa. Na via humoral, embora o cérebro seja protegido pela barreira hematoencefálica da difusão de determinados tipos de moléculas, existem muitos mecanismos que permitem que citocinas circulantes interajam com tecidos nervosos. As citocinas são moléculas lipofóbicas relativamente grandes, portanto, acredita-se que não podem se difundir passivamente até o cérebro, embora existam evidências deste tipo de transporte (Vitkovic *et al.*, 2000). Conseqüentemente, muitas das vias identificadas até o momento envolvem a interação das citocinas com receptores celulares de tecidos localizados externamente à barreira hematoencefálica. Tais tecidos incluem as meninges, plexo coróide, o endotélio associado à barreira hematoencefálica, e também regiões cerebrais especializadas, denominadas órgãos circunventriculares e epêndima ventricular (Goehler & Gaykema, 2007). Nos capilares presentes na barreira hematoencefálica, as citocinas circulantes podem ainda induzir a produção de outros mediadores inflamatórios, como a prostaglandina E₂, que então se difundem para o cérebro. A via nervosa, por sua vez, envolve a participação de nervos aferentes, como, por exemplo, o nervo vago. As citocinas presentes em locais inervados ativam os nervos aferentes, e estes então estimulam diretamente determinadas áreas cerebrais ou induzem a produção central de novas moléculas de citocinas (Maier & Watkins, 1999; Dantzer *et al.*, 2000; Konsman *et al.*, 2002; Maier, 2003; Dantzer *et al.*, 2008) (Figura 1).

No sistema nervoso central as citocinas e seus receptores são expressos não só em situações patológicas, mas também são expressos constitutivamente. Tal fato

apóia a possibilidade de que estas moléculas possuam funções não imunológicas no cérebro (Vitkovic *et al.*, 2000). Gadiant e Otten (1995), por exemplo, utilizando a técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), verificaram a presença da citocina IL-6 e de seu receptor (IL-6R) em cérebros de ratos em condições normais. Neste trabalho, a região cerebral com a expressão mais pronunciada foi o hipocampo. Resultado semelhante foi obtido por Schöbitz e colaboradores (1992, 1993) através da utilização da técnica de hibridização *in situ*. Neste estudo, os autores relataram ainda a maior marcação do giro denteado dentre as áreas da formação hipocampal, e também a marcação das áreas ventromedial e dorsomedial do hipotálamo. De acordo com estes resultados, os autores sugerem que a IL-6 possa afetar diretamente neurônios hipotalâmicos envolvidos no controle do apetite, e também modular respostas comportamentais relacionadas ao hipocampo.

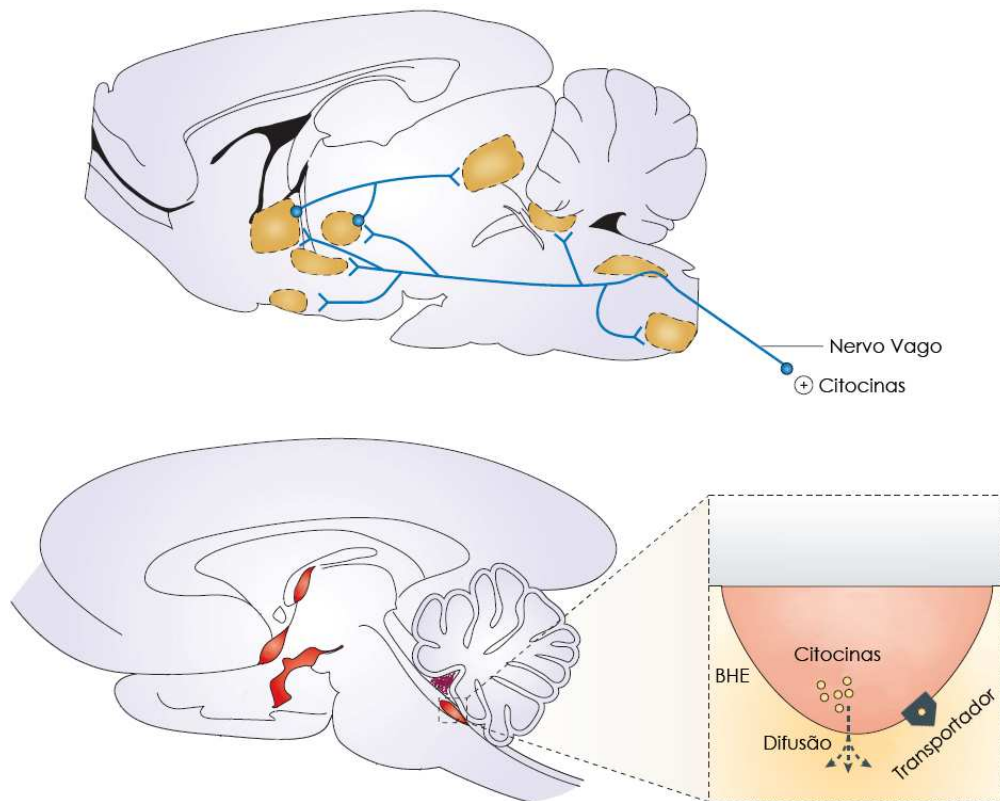


Figura 1 | Vias pelas quais as citocinas produzidas periféricamente se comunicam com o sistema nervoso central. Na via nervosa (acima) as citocinas presentes nos locais enervados ativam os nervos aferentes (exemplo: nervo vago), e estes então estimulam determinadas áreas cerebrais ou induzem a produção central de novas moléculas de citocinas. Na via humoral (abaixo) as citocinas produzidas vão para a circulação e, ao chegar à barreira hematoencefálica (BHE), podem ultrapassá-la por difusão ou através de transportadores específicos. Em vermelho estão indicados os órgãos circunventriculares. Retirado e modificado de Dantzer *et al.*, 2008.

1.3.1 | Citocinas e regulação do sono

Provavelmente, a função não imunológica mais conhecida das citocinas no contexto do sistema nervoso central é a participação na regulação do sono. Aristóteles, em 334 a.C., já documentava a interação entre o sono e o sistema imunológico quando percebeu, em humanos, que o sono se modificava na vigência de uma doença. Somente no início do século XX surgiu a teoria da “hipnotoxina”, derivada dos estudos de Ishimori em 1909, e de Legendre e Piéron em 1913. Ishimori e Legendre e Piéron foram os primeiros pesquisadores a introduzir o conceito e as evidências experimentais da participação de fatores químicos na indução do sono. Os grupos destes dois pesquisadores, independentemente, extraíram uma “substância hipnogênica”, ou “hipnotoxina”, de tecidos cerebrais, fluido cerebroespinal, e sangue de cães privados de sono. Estas substâncias, quando administrados em cães saudáveis e não privados, induziam um aumento expressivo do sono (Ishimori, 1909; Legendre & Piéron, 1913). No ano de 1983 relatou-se pela primeira vez a atuação de uma citocina na regulação do sono (Krueger *et al.*, 1983), e desde então muitos outros mediadores inflamatórios também já foram relacionados a esta função (Opp, 2005; Krueger *et al.*, 2007) (Figura 2).

Sabe-se que em doenças infecciosas e inflamatórias, nas quais a concentração de citocinas se encontra elevada, há aumento do sono (Toth & Kruger, 1988). Este efeito pode ser mimetizado pela exposição a componentes microbianos, como o LPS e o muramil peptídeo, já que são potentes indutores da secreção de citocinas (Mullington *et al.*, 2000). Todos estes fatores, assim como a administração das próprias

citocinas, alteram não só a quantidade de sono, mas também sua arquitetura. Geralmente se observa aumento do sono NREM e diminuição do sono REM (Bryant *et al.*, 2004; Imeri & Opp, 2009).

A participação das citocinas IL-1 β e TNF- α na regulação do sono e seus estágios já está bem estabelecida na literatura (Opp, 2005; Krueger *et al.*, 2007), porém, os dados referentes à citocina IL-6 são relativamente mais escassos e controversos. Já foi demonstrado que a administração subcutânea de IL-6 em humanos diminui o sono NREM na primeira metade da noite, aumenta este mesmo estágio na segunda parte, e também suprime o sono REM (Späth-Schwalbe *et al.*, 1998). Resultado similar já foi observado em modelos animais: Hogan e colaboradores (2003) realizaram administrações intracerebroventriculares de IL-6 e observaram aumento inicial de sono de ondas lentas, e posterior supressão deste mesmo estágio. Porém, neste caso, o sono paradoxal não sofreu alteração significativa. Em um trabalho recente, foi relatado que a administração intracerebroventricular de uma molécula denominada de *hyper-IL-6* aumenta significativamente o sono paradoxal. A molécula *hyper-IL-6* é resultado da fusão da IL-6 com seu receptor solúvel, e este, diferentemente do receptor solúvel de outras citocinas, atua como agonista (May *et al.*, 2009). Dessa maneira, os dados indicam que, provavelmente, a IL-6 atua na regulação tanto do sono NREM, quanto do REM.

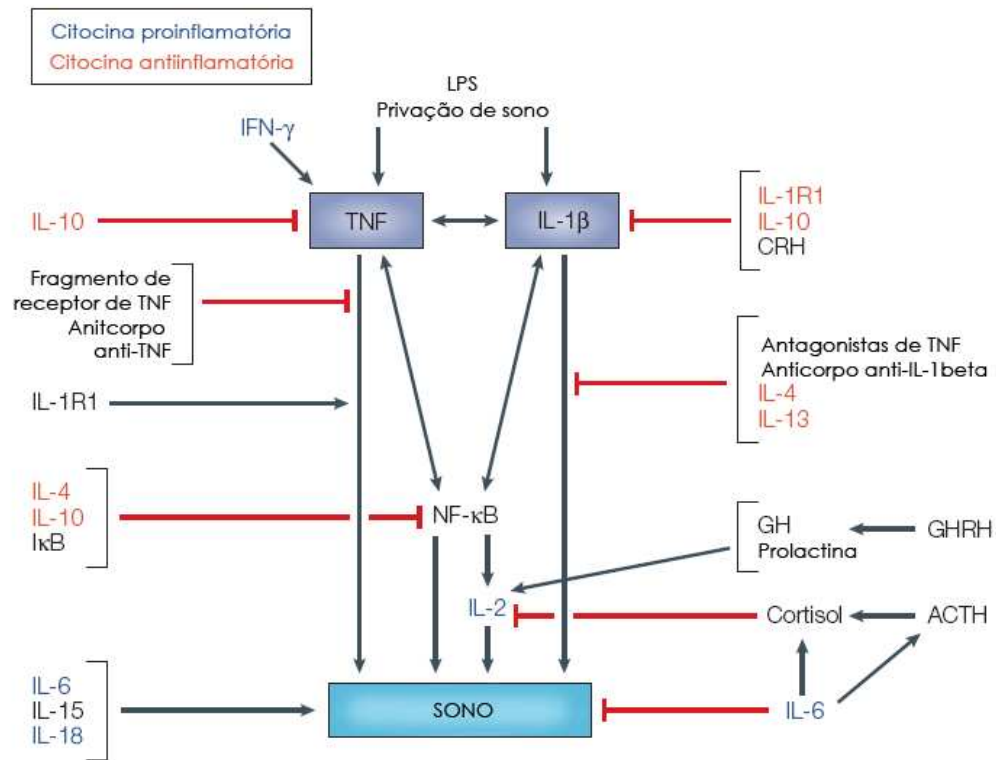


Figura 2| Ilustração das supostas vias de interação entre mediadores inflamatórios e o sono. Observa-se geralmente que citocinas pró-inflamatórias induzem o sono, enquanto que citocinas anti-inflamatórias inibem o sono. ACTH – hormônio adrenocorticotrópico, CRH – hormônio liberador de corticotropina, GH – hormônio do crescimento, GHRH – hormônio de liberação do hormônio do crescimento, IκB – inibidor do NF-κB, IL – interleucina, IL-1R1 – receptor tipo 1 da interleucina-1, LPS – lipopolissacarídeo, NF-κB – fator nuclear κB, TNF – fator de necrose tumoral. Retirado e modificado de Bryant *et al.*, 2004.

Além dos trabalhos que conduzem administrações de diferentes citocinas para verificar o papel destes mediadores inflamatórios na regulação do sono, existem ainda estudos que empregam a privação de sono nesta investigação. A primeira evidência da relação entre o sono e o sistema imunológico surgiu em um estudo que utilizou esta manipulação. Em 1979 Palmblad e colaboradores relataram que a privação de sono aumentava a habilidade dos leucócitos em produzir interferon (IFN), e atualmente sabe-se que muitos outros mediadores inflamatórios são alterados quando o organismo não dorme. Trabalhos com animais já relataram que a privação de sono eleva a concentração das citocinas IL-1 β , TNF- α , e IL-6 (Hu *et al.*, 2009; Yehuda *et al.*, 2009), enquanto que outros observaram o aumento apenas da IL-1 β (Everson, 2005). Os estudos com humanos, por sua vez, já relataram aumento da secreção de IL-6 e TNF- α após restrição de sono (Vgontzas *et al.*, 2004), e o autor deste mesmo trabalho também já relatou que o déficit de sono está associado a elevação da concentração de IL-6 (Vgontzas *et al.*, 2003). Por outro lado, trabalhos também já relataram a diminuição da IL-6 após a privação de sono total (Haack *et al.*, 2002; Frey *et al.*, 2007). Como visto, neste tipo de abordagem os resultados são controversos, porém, tais discrepâncias podem ser decorrentes dos diferentes métodos de privação de sono, do tempo de privação, e até mesmo do tipo de método utilizado para a quantificação das citocinas.

A relação entre mediadores inflamatórios e sono também é observada em estudos clínicos. A modificação da concentração de determinadas citocinas é relatada em alguns distúrbios do sono, como, por exemplo, na apnéia do sono. A apnéia do sono é um distúrbio altamente prevalente na população (Tufik *et al.*, 2010) e

é caracterizada por repetidas interrupções da respiração durante o sono, levando à fragmentação deste. Isto leva a uma série de consequências, dentre elas déficits cognitivos (Aloia *et al.*, 2004) e secreção de mediadores inflamatórios, tais como a IL-6 e PCR (proteína c-reativa) (Mills & Dimsdale, 2004).

1.4 | Citocinas e cognição

Sabe-se atualmente que as citocinas participam não só de funções relacionadas ao sistema imunológico, mas podem participar também de funções complexas do sistema nervoso central, como, por exemplo, a cognição (Maier & Watkins, 1998; Wilson *et al.*, 2002; McAfoose & Baune, 2009). O termo cognição geralmente se refere a um conjunto de processos, como a atenção, funções executivas, consciência, e linguagem. Recentemente, surgiu o interesse particular em investigar o envolvimento das citocinas em um determinado processo cognitivo: o aprendizado e memória. Mais especificamente, esta linha de pesquisa direcionou seus esforços em esclarecer a função das citocinas no aprendizado e memória dependentes de hipocampo, como é o caso da memória espacial, da memória para reconhecimento de objetos e do condicionamento de medo ao contexto (McAfoose & Baune, 2009). As primeiras evidências do envolvimento das citocinas em processos cognitivos surgiram de observações do uso destas moléculas como agentes terapêuticos. Indivíduos psiquiatricamente normais que receberam sistemicamente

citocinas como IFN- α , IL-2, e TNF- α em doses terapêuticas, frequentemente relatavam queixas somáticas, anorexia, e efeitos colaterais neuropsiquiátricos, incluindo mau humor, distúrbios do sono, falta de motivação, e prejuízo de raciocínio (Licinio *et al.*, 1998).

A literatura indica que, tanto a superexpressão, quanto a ausência das citocinas IL-1 β , TNF- α , e IL-6, alteram memórias dependentes de hipocampo e várias formas de plasticidade sináptica (McAfoose & Baune, 2009). Com relação a IL-6, por exemplo, já foi relatado que camundongos *knock-out* para esta citocina apresentam melhor desempenho na aquisição de uma tarefa em labirinto radial e redução do efeito amnésico da escopolamina (Braidia *et al.*, 2004). Porém, outro grupo de pesquisadores observou que este mesmo tipo de animal transgênico apresenta pior desempenho no labirinto aquático de Morris e em uma tarefa de reconhecimento de objetos (Baier *et al.*, 2009). Estudos neurofisiológicos também corroboram com a hipótese do envolvimento da IL-6 em processos de aprendizagem e memória: Li e colaboradores (1997) mostraram que a IL-6 pode suprimir a indução da LTP, mecanismo provavelmente envolvido na formação de memórias, enquanto que Balschun e colaboradores (2004) demonstraram que a neutralização da IL-6 fortalece a manutenção da LTP. A IL-6 participa ainda do processo de neurogênese, que já foi relacionado à consolidação de memórias e a alguns aprendizados dependentes de hipocampo (Bruehl-Jungferman *et al.*, 2005; Drapeau *et al.*, 2003; Saxe *et al.*, 2007; Shors *et al.*, 2002). Vallieres e colaboradores (2002), por exemplo, evidenciaram que camundongos que superexpressam a IL-6 apresentam redução de 63% da neurogênese no giro denteado. Monje e colaboradores (2003) relacionaram ainda o

aumento dos níveis de IL-6 a uma disfunção nas células tronco neuronais e a um declínio no aprendizado e memória. Estes dados, em conjunto, evidenciam o envolvimento da IL-6 no processo de formação de memórias. É plausível especular que este mediador inflamatório esteja também relacionado ao prejuízo de memória resultante da privação de sono, já que, como foi evidenciado anteriormente, a concentração desta citocina se altera quando há um débito de sono (Hu *et al.*, 2009; Yehuda *et al.*, 2009; Vgontzas *et al.*, 2004; Vgontzas *et al.*, 2003; Haack *et al.*, 2002; Frey *et al.*, 2007).

2 | JUSTIFICATIVA

Apesar dos inúmeros estudos sobre o sono já realizados, muitas questões sobre este fenômeno ainda precisam ser esclarecidas. Além da questão fundamental sobre qual é a função do sono, outro aspecto muito importante ainda não está claro: o que a privação de sono causa no organismo? É evidente que na sociedade atual a privação de sono está se tornando um hábito. Nossa atual prática de dormir menos é fortemente determinada por mudanças sociais, incluindo grandes jornadas de trabalho, trabalho em turno, e até mesmo pelo aumento da acessibilidade aos variados meios de comunicação. Além disso, existem ainda os distúrbios do sono, que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Só na cidade de São Paulo estima-se, por exemplo, que cerca de 30% da população tenha apnéia do sono (Tufik *et al.*, 2010). Outros estudos mostraram ainda que em São Paulo há um significativo e progressivo aumento de queixas relacionadas ao sono (Pires *et al.*, 2007). A diminuição do tempo de sono está associada a um amplo conjunto de consequências prejudiciais, com espantosas ramificações relacionadas à saúde pública. Por exemplo, curtos períodos de perda de sono após uma vacinação reduzem a efetividade da vacina (Spiegel *et al.*, 2002), e a diminuição do tempo de sono está relacionada à obesidade (Hasler *et al.*, 2004; Taheri *et al.*, 2004), diabetes (Gottlieb *et al.*, 2005), e doenças cardiovasculares (Ayas *et al.*, 2003). Dessa maneira, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de estudos que possam esclarecer o impacto da privação de sono na saúde. Nota-se ainda que há uma intrincada relação entre o sono e o sistema imunológico, e que é possível que mediadores inflamatórios como as

citocinas estejam relacionados ao prejuízo de memória observado após a privação de sono. Porém, este potencial dos mediadores inflamatórios foi pouco explorado até o momento, e mais estudos são necessários para se obter dados mais concretos sobre a influência das citocinas no funcionamento cognitivo.

3 | OBJETIVO

Dadas as evidências dos efeitos da privação de sono sobre a concentração de mediadores inflamatórios, e do provável potencial destas moléculas em alterar processos de aprendizado e memória, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a participação de mediadores inflamatórios no prejuízo de memória de ratos privados de sono. Especificamente:

1. Avaliar os efeitos da administração de LPS, um potente estimulador da secreção de citocinas, no desempenho de animais controle e privados de sono na tarefa de esquiva inibitória;
2. Avaliar os efeitos do bloqueio crônico e agudo da IL-6 endógena no desempenho dos animais privados de sono e do grupo controle na tarefa de esquiva inibitória;
3. Além disso, o presente estudo teve como objetivo secundário avaliar a participação destes mediadores inflamatórios na perda de peso em animais privados de sono.

4 | MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 | Animais

Foram utilizados ratos machos *Wistar* de 3 meses de idade, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram transferidos para o Departamento de Psicobiologia da UNIFESP ao menos sete dias antes de cada experimento para poderem se aclimatar ao novo ambiente. Todo o estudo foi conduzido em condições de luz (12 horas claro e 12 horas escuro, com luzes acesas às 7h00) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) controladas automaticamente. Ração e água foram mantidas à vontade nas gaiolas-moradia. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP (processo número 0590/08).

4.2 | Habituação à manipulação e medição de peso

Cinco dias antes de cada experimento todos os animais foram habituados à manipulação pelo experimentador. Neste período os animais tinham o peso registrado

diariamente no mesmo horário (9h00). Este procedimento também foi adotado durante os experimentos.

4.3 | Privação de sono

Os animais foram privados de sono pelo método das plataformas múltiplas modificado (Sucheki & Tufik, 2000) durante 96 horas. Neste método os animais são colocados em um tanque (123 x 44 x 44 cm) contendo água e plataformas circulares de 6,5 cm de diâmetro, nas quais tendem a ficar acomodados. O nível da água permanece cerca de dois centímetros abaixo da superfície das plataformas. O número de plataformas sempre excede o número de animais para que estes possam se locomover livremente, evitando o estresse da restrição de movimento. Durante a privação de sono, a cada momento de atonia muscular (evento característico do sono REM), o animal posicionado em cima da plataforma encosta ou cai na água e, como consequência, acorda. Jouvett e colaboradores (1964) desenvolveram esta técnica para privação de sono REM em gatos e, posteriormente, Cohen e Dement (1965) adaptaram-na para ratos (Figura 3).

Dois dias antes do início do experimento, todos os animais foram submetidos à habituação ao método das plataformas múltiplas modificado por 1 hora ao dia. Porém, para os animais controle (que não foram privados de sono) este processo se

estendeu por mais cinco dias (intervalo paralelo ao período de privação de sono do grupo experimental), com duração de 30 minutos por dia neste período. Este procedimento foi adotado para evitar diferenças quanto à sensibilidade dos animais ao choque na tarefa comportamental.

Após a privação de sono, os animais retornavam para as gaiolas-moradia e era permitido um período de recuperação de 24 horas. Neste período se observa o fenômeno do rebote de sono, caracterizado principalmente por aumento no tempo total de sono e do sono paradoxal, e redução do sono de ondas lentas (Machado *et al.*, 2004).

Todos os animais tiveram livre acesso à comida e à água durante todo o período de habituação, privação de sono e recuperação.

4.4 | Tarefa de esquiva inibitória

Para avaliar a memória dos animais foi utilizada a tarefa de esquiva inibitória. O aparelho de esquiva inibitória consiste basicamente em duas caixas acrílicas conectadas por uma porta guilhotina. As paredes da caixa, ou compartimento seguro, são brancas, enquanto que o outro compartimento, onde os animais recebem um estímulo aversivo, possui paredes pretas. A tampa do aparelho é feita de acrílico

transparente, e cobre os dois compartimentos. A base da caixa é formada por grades metálicas distantes 1,2 cm uma da outra e com 0,4 cm de diâmetro cada uma. A base está conectada a um gerador de choque elétrico que pode ocasionar choques nas patas dos animais apenas quando eles estiverem no compartimento escuro (Figura 4).

A tarefa de esquiva inibitória foi realizada em duas etapas. No treino, cada animal foi inicialmente colocado dentro do compartimento claro (seguro) do aparelho. Dez segundos depois a porta guilhotina foi aberta e, assim que o animal entrou com as quatro patas no compartimento escuro, fechou-se a porta guilhotina novamente e os choques foram aplicados. Neste trabalho foi utilizado o protocolo de 5 choques de 0,8 mA, duração de 1 segundo cada um, e em intervalos de 15 segundos. O tempo que o animal levou para entrar com as quatro patas no compartimento escuro foi registrado, e foi denominado de latência de passagem. Após 24 horas da realização do treino foi realizado o teste. Neste momento, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento do treino e a latência de passagem foi registrada novamente. Porém, diferente do treino, nenhum choque é apresentado durante o teste. Quando o animal não passou para o compartimento escuro dentro de 300 segundos (latência limite), ele foi retirado do aparelho de esquiva inibitória e a latência de 300 segundos foi registrada para este animal.

Para amenizar a interferência circadiana as sessões de treino e de teste sempre se iniciaram no mesmo horário, e, no teste, os animais foram submetidos ao aparelho de esquiva inibitória na mesma ordem que no treino.

Outros cuidados ainda foram tomados para evitar a generalização da associação do estímulo aversivo com outras pistas do ambiente. As caixas utilizadas para o transporte dos animais no treino e teste eram diferentes, assim como o produto utilizado para limpar internamente o aparelho de esquila inibitória.

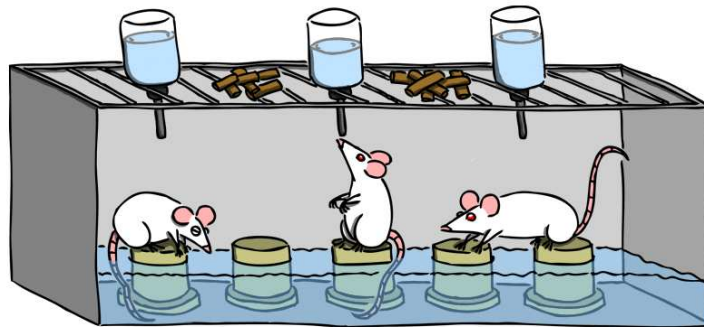


Figura 3 | Ilustração do tanque de privação de sono no método das plataformas múltiplas modificado (Suchecki & Tufik, 2000).

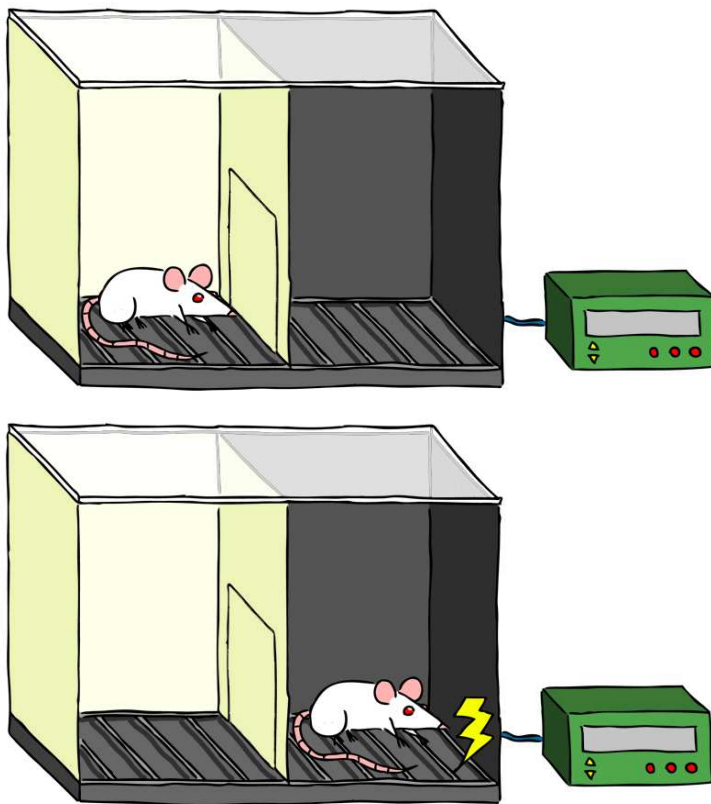


Figura 4 | Ilustração da tarefa de esquia inibitória.

No treino, o animal é colocado no compartimento claro do aparelho de esquia inibitória, e, ao passar para o compartimento escuro, recebe um estímulo aversivo (choque). No teste, realizado

24 horas depois, o procedimento é o mesmo, porém, não há choque. Nos dois momentos registra-se a latência de passagem, que posteriormente serão comparadas.

4.5 | Drogas

4.5.1 | Lipopolissacarídeo (LPS)

Foi realizada a administração de LPS (*Escherichia coli*, sorotipo O111:B4, 500.000 unidades de endotoxina/mg, L2630, Sigma, Saint Louis), nas doses 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, pela via intraperitoneal, para induzir a produção de mediadores inflamatórios. As doses foram estabelecidas de acordo com dados da literatura (Lockey *et al.*, 2009; Skinner *et*

al., 2009), seguindo o critério de não produzir prostração que pudesse interferir no teste comportamental.

Para produzir as soluções a serem administradas, 1000 e 1500 µg de LPS foram diluídos em 20 mL de água bidestilada, resultando em soluções de concentração 50 e 75 µg/mL, respectivamente. O volume de solução administrada para cada animal seguia a proporção de 0,1 mL de solução para cada 100 g de peso corporal.

4.5.2 | Anticorpo anti-IL-6

Para bloquear a atividade biológica da IL-6 endógena foi administrado um anticorpo anti-IL-6 na dose 2 µg/Kg, pela via intraperitoneal (AF506, R&D Systems, Minneapolis). A dose foi estabelecida de acordo com dados da literatura (Smith *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008).

O conteúdo de uma ampola (100 µg) foi reconstituído em 10 mL de PBS (*phosphate-buffered saline*), resultando em uma solução estoque de concentração 10 µg/mL. Em cada dia de administração 2 mL da solução estoque eram diluídos em 8 mL de PBS, resultando na solução final de concentração 2 µg/mL. O volume de solução administrada em cada animal seguia a proporção de 0,1 mL de solução para cada 100 g de peso corporal.

4.6 | Análise estatística

As medidas de peso e as latências de passagem na tarefa de esquiva inibitória foram analisadas através da ANOVA de medidas repetidas para o fator tempo. Na análise *post-hoc* das interações cujo efeito foi significativo foi utilizado o teste de Duncan, para os dados da tarefa comportamental, e o teste de Bonferroni, para os dados de peso corporal. Os valores estão representados pela média e erro padrão. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

4.7 | Delineamento experimental

4.7.1 | Experimento 1: Efeitos do LPS sobre o desempenho na tarefa de esquiva inibitória

Objetivo específico – Avaliar os efeitos da administração de LPS, um potente estimulador da secreção de citocinas, no desempenho de animais controle e privados de sono na tarefa de esquiva inibitória.

Delineamento experimental – Os animais foram divididos em quatro grupos para cada dose de LPS: animais controle (CT) e privados de sono (PS) tratados com veículo ou LPS (CT+Veículo, CT+LPS, PS+Veículo, e PS+LPS). Após o período de habituação, os grupos

PS foram privados de sono por 96 horas, enquanto que os grupos CT permaneceram em suas gaiolas-moradia na mesma sala onde foi realizada a privação de sono e foram diariamente habituados ao tanque de PS (30 minutos por dia). No último dia do período de PS os animais receberam administrações de veículo ou LPS (50 ou 75 µg/Kg, ip) as 10h00. Três horas depois, ao final da PS, todos foram submetidos ao treino da tarefa de esquiva inibitória. Após o treino, os animais retornaram para as gaiolas-moradia, e foi permitido um período de recuperação de sono de 24 horas. A seguir, foi aplicado o teste da tarefa de esquiva inibitória. O peso dos animais foi mensurado diariamente as 9h00, exceto no último dia de experimento, no qual os animais foram pesados após o teste da tarefa de esquiva inibitória (Figura 5).

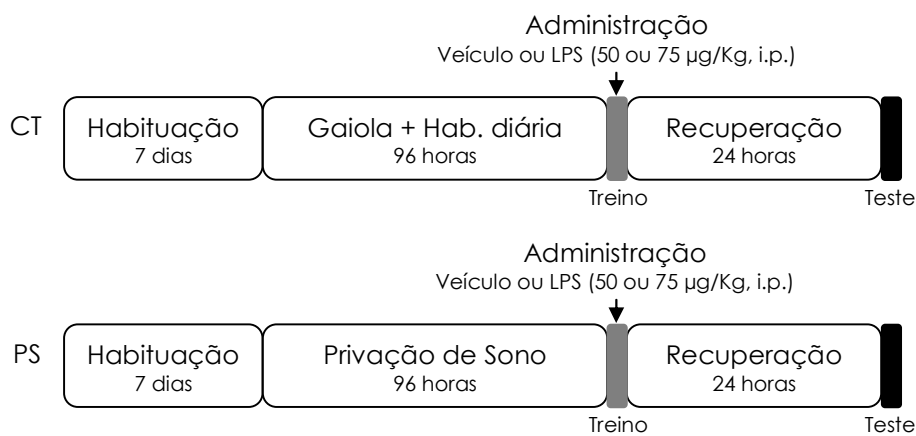


Figura 5 | Representação esquemática do experimento 1.

4.7.2| Experimento 2: Efeitos do bloqueio da IL-6 sobre o desempenho na tarefa de esquiva inibitória

Objetivo específico – Avaliar os efeitos do bloqueio da IL-6 endógena, através da administração do anticorpo anti-IL-6, no desempenho de animais controle e privados de sono na tarefa de esquiva inibitória. Avaliar diariamente o peso dos animais para acompanhar a progressão da privação de sono e ação do anticorpo anti-IL-6.

Delineamento experimental – Os animais foram divididos em quatro grupos para cada tipo de tratamento (agudo e crônico): animais controle (CT) e privados de sono tratados com veículo ou anticorpo anti-IL-6 (Ac) (CT+Veículo, CT+Ac, PS+Veículo, e PS+Ac). Após a habituação, os grupos PS foram privados de sono por 96 horas, enquanto que os grupos CT permaneceram em suas gaiolas-moradia e foram diariamente habituados ao tanque de privação de sono (30 minutos por dia). No tratamento agudo os animais receberam apenas uma administração, de veículo ou de anticorpo anti-IL-6 (2 µg/Kg, i.p.), no último dia do período de privação de sono (Figura 6). Já no tratamento crônico os animais receberam administrações diárias durante o período de privação de sono (Figura 7). Todas as administrações ocorreram as 10h00. Três horas após a última administração os animais foram submetidos ao treino da tarefa de esquiva inibitória. Após o treino, todos os animais retornaram para as gaiolas-moradia, e foi permitido um período de recuperação de 24 horas. A seguir, os animais foram submetidos ao teste da tarefa de esquiva inibitória. O peso dos animais foi mensurado diariamente as 9h00, exceto no último dia de experimento, no qual os animais foram pesados após o teste da tarefa de esquiva inibitória.

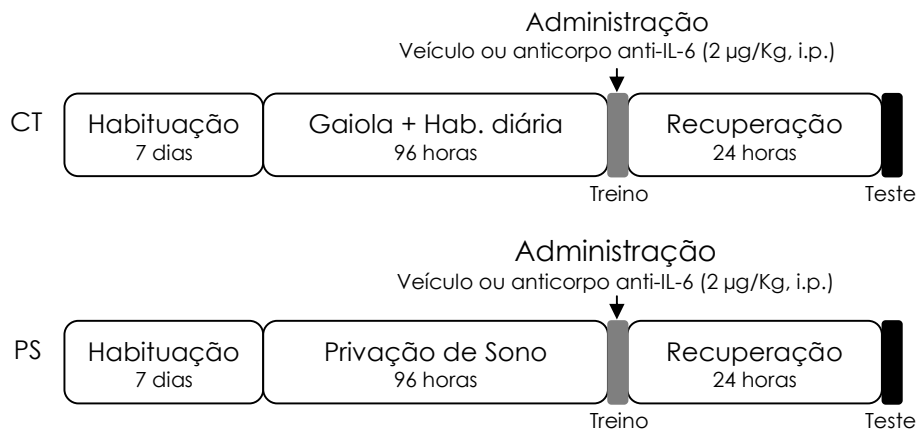


Figura 6 | Representação esquemática do tratamento agudo do experimento 2.

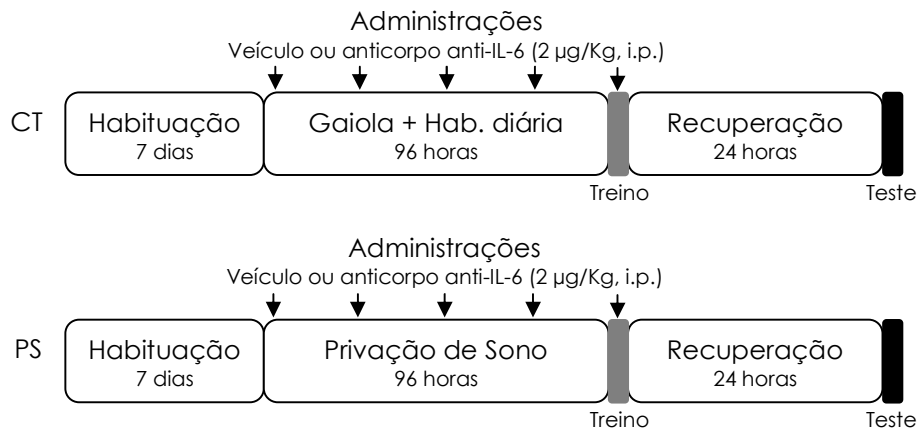


Figura 7 | Representação esquemática do tratamento crônico do experimento 2.

5 | RESULTADOS

5.1 | Experimento 1: Efeitos do LPS sobre o desempenho na tarefa de esquiva inibitória

5.1.1 | Tarefa de esquiva inibitória

Nos tratamentos com ambas as doses de LPS a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do grupo (Dose 50 µg/Kg: $F_{3,36}=3,859$ $p\leq 0,017$) (Dose 75 µg/Kg: $F_{3,44}=16,130$ $p\leq 0,001$), do tempo (Dose 50 µg/Kg: $F_{1,36}=227,766$ $p\leq 0,001$) (Dose 75 µg/Kg: $F_{1,44}=383,042$ $p\leq 0,001$) e da interação entre grupo e tempo (Dose 50 µg/Kg: $F_{3,36}=5,383$ $p\leq 0,003$) (Dose 75 µg/Kg: $F_{3,44}=14,113$ $p\leq 0,001$).

O teste *post-hoc* de Duncan para a interação revelou que no treino não houve diferença significativa entre as latências de passagem dos grupos, porém, comparando as latências do treino e teste, um aumento significativo foi observado no segundo dia (Dose 50 µg/Kg e 75 µg/Kg: $p\leq 0,001$ para todos os grupos). No teste, os grupos privados de sono apresentaram latências de passagem significativamente menores quando comparados com os respectivos grupos controle (Dose 50 µg/Kg: PS+Veículo $p\leq 0,001$; PS+LPS $p\leq 0,001$) (Dose 75 µg/Kg: PS+Veículo e PS+LPS $p\leq 0,001$), mas apenas no tratamento com a dose de 75 µg/Kg de LPS o grupo PS+LPS apresentou

latências significativamente maiores em comparação com o grupo PS+Veículo ($p \leq 0,002$) (Figura 9).

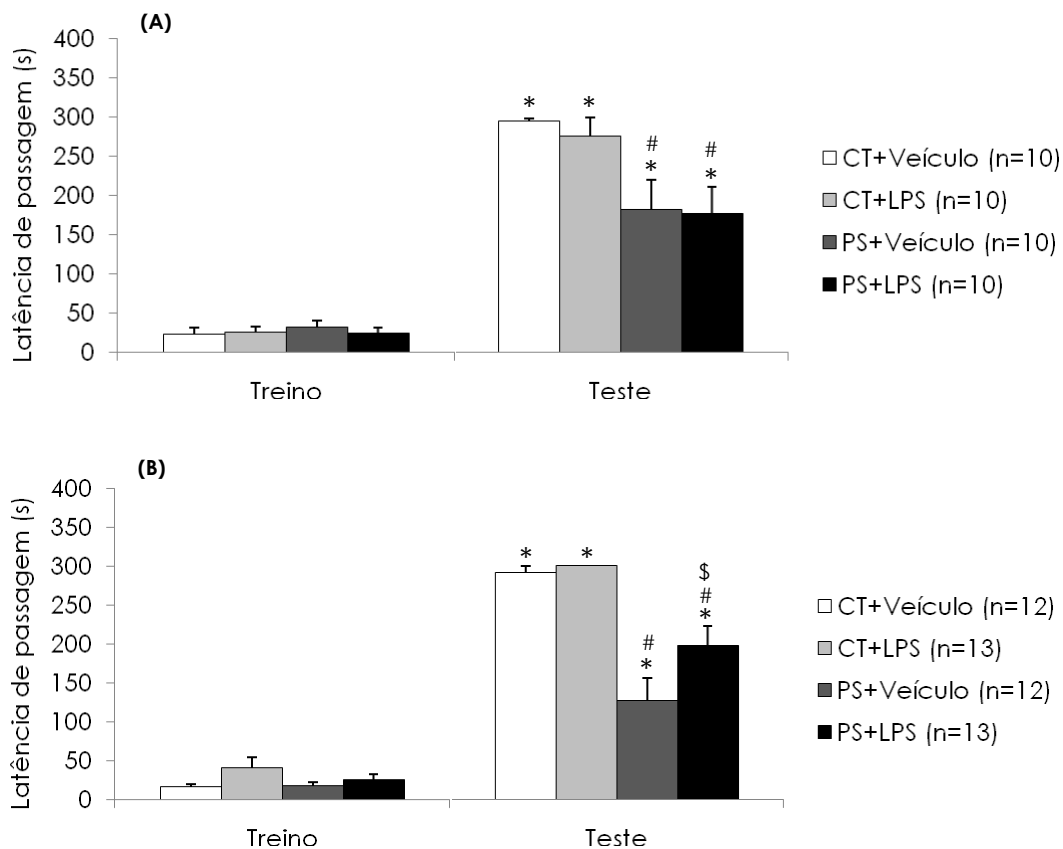


Figura 9 | Latências de passagem de animais controle (CT) e privados de sono (PS) na tarefa de esQUIVA inibitória após tratamento com veículo ou LPS. **(A)** Tratamento com veículo ou LPS na dose de 50 µg/Kg (*vs treino: CT+Veículo, CT+LPS, PS+Veículo e PS+LPS $p \leq 0,001$) (#vs respectivo grupo CT no teste: PS+Veículo e PS+LPS $p \leq 0,001$). **(B)** Tratamento com veículo ou LPS na dose de 75 µg/Kg (*vs treino: CT+Veículo, CT+LPS, PS+Veículo e PS+LPS $p \leq 0,001$) (#vs respectivo grupo CT no teste: PS+Veículo e PS+LPS $p \leq 0,001$) (\$vs grupo PS+Veículo no teste $p \leq 0,002$) (Média ± Erro padrão).

5.1.2 | Peso corporal

A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do grupo ($F_{3,36}=2,920$ $p\leq 0,047$), do tempo ($F_{2,72}=106,257$ $p\leq 0,001$), e da interação entre grupo e tempo ($F_{6,72}=48,393$ $p\leq 0,001$) no tratamento com a dose de 50 $\mu\text{g/Kg}$ de LPS. Já no tratamento com a dose de 75 $\mu\text{g/Kg}$ de LPS a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tempo ($F_{2,92}=287,075$ $p\leq 0,001$) e da interação entre grupo e tempo ($F_{6,92}=75,813$ $p\leq 0,001$). Neste caso, não houve efeito do grupo.

Em ambos os tratamentos o teste *post-hoc* de Bonferroni para a interação evidenciou que não houve diferença significativa entre o peso dos grupos na medida basal (0h). Após 96 horas de experimento houve aumento significativo de peso nos grupos controle (Dose 50 $\mu\text{g/Kg}$: CT+Veículo $p\leq 0,002$; CT+LPS $p\leq 0,003$) (Dose 75 $\mu\text{g/Kg}$: CT+Veículo $p\leq 0,002$; CT+LPS $p\leq 0,001$), e redução nos grupos privados de sono (Dose 50 $\mu\text{g/Kg}$: PS+Veículo e PS+LPS $p\leq 0,001$) (Dose 75 $\mu\text{g/Kg}$: PS+Veículo e PS+LPS $p\leq 0,001$). Um dia após as administrações houve redução de peso significativa nos grupos que receberam LPS na dose de 50 $\mu\text{g/Kg}$ (CT+LPS e PS+LPS $p\leq 0,001$). Porém, no experimento com a dose de 75 $\mu\text{g/Kg}$ de LPS a redução significativa de peso ocorreu em todos os grupos (para todos os grupos $p\leq 0,001$) (Figura 10).

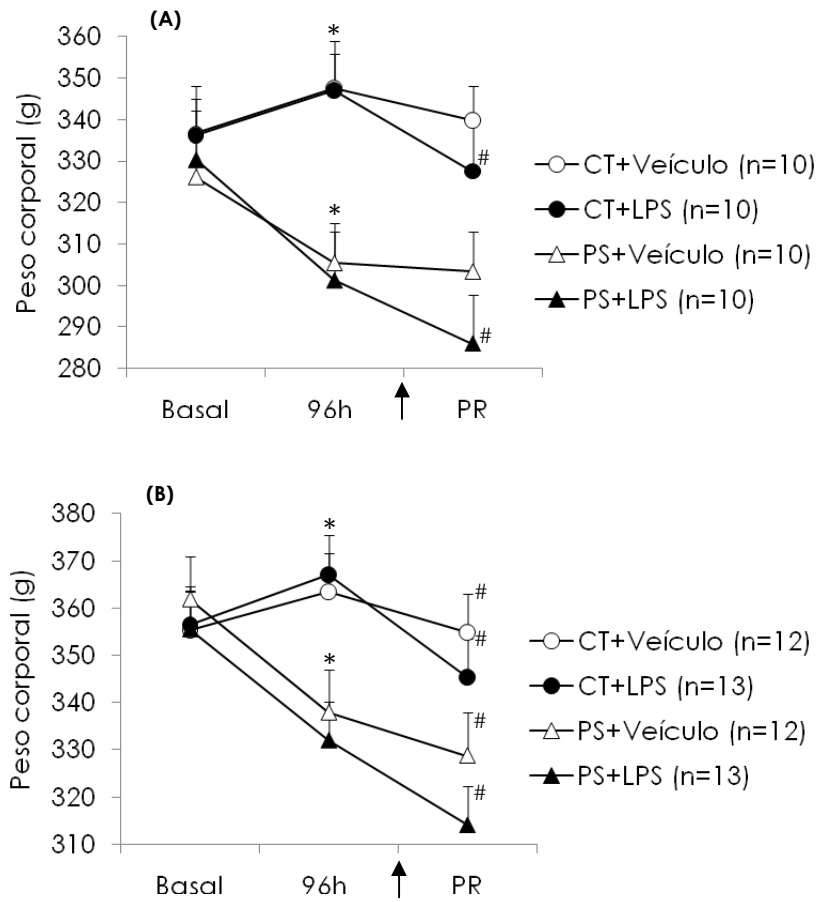


Figura 10 | Peso corporal de animais controle (CT) e privados de sono (PS) tratados com veículo ou LPS no momento basal, após 96 horas de experimento, e após o período de recuperação (PR). As setas indicam os momentos das administrações. **(A)** Tratamento com veículo ou LPS na dose de 50 µg/Kg (*vs basal: CT+Veículo $p \leq 0,002$; CT+LPS $p \leq 0,003$, PS+Veículo e PS+LPS $p \leq 0,001$) (#vs 96h: CT+LPS e PS+LPS $p \leq 0,001$). **(B)** Tratamento com veículo ou LPS na dose de 75 µg/Kg (*vs basal: CT+Veículo $p \leq 0,002$; CT+LPS $p \leq 0,001$; PS+Veículo e PS+LPS $p \leq 0,001$) (#vs 96h: $p \leq 0,001$ para todos os grupos) (Média \pm Erro padrão).

5.2 | Experimento 2: Efeitos do bloqueio da IL-6 sobre o desempenho na tarefa de esquiva inibitória

5.2.1 | Tarefa de esquiva inibitória

No tratamento agudo com o anticorpo anti-IL-6 a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do tempo ($F_{1,37}=99,889$ $p\leq 0,001$) e da interação entre tempo e grupo ($F_{3,37}=3,208$ $p\leq 0,03$), porém, não houve efeito do grupo. Já no tratamento crônico, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do grupo ($F_{3,32}=11,565$ $p\leq 0,001$), do tempo ($F_{1,32}=303,979$ $p\leq 0,001$), e da interação entre grupo e tempo ($F_{3,32}=21,882$ $p\leq 0,001$).

Em ambos os tratamentos, o teste *post-hoc* de Duncan para a interação evidenciou que no treino não houve diferença significativa entre as latências de passagem dos grupos. No teste, houve aumento significativo das latências em todos os grupos (Tratamento agudo: CT+Veículo e CT+Ac $p\leq 0,001$; PS+Veículo $p\leq 0,006$; PS+Ac $p\leq 0,001$) (Tratamento crônico: $p\leq 0,001$ para todos os grupos), e os grupos privados de sono apresentaram latências significativamente menores em comparação com seus respectivos grupos controle (Tratamento agudo: PS+Veículo $p\leq 0,029$, PS+Ac $p\leq 0,046$) (Tratamento crônico: PS+Veículo e PS+Ac $p\leq 0,001$) (Figura 11).

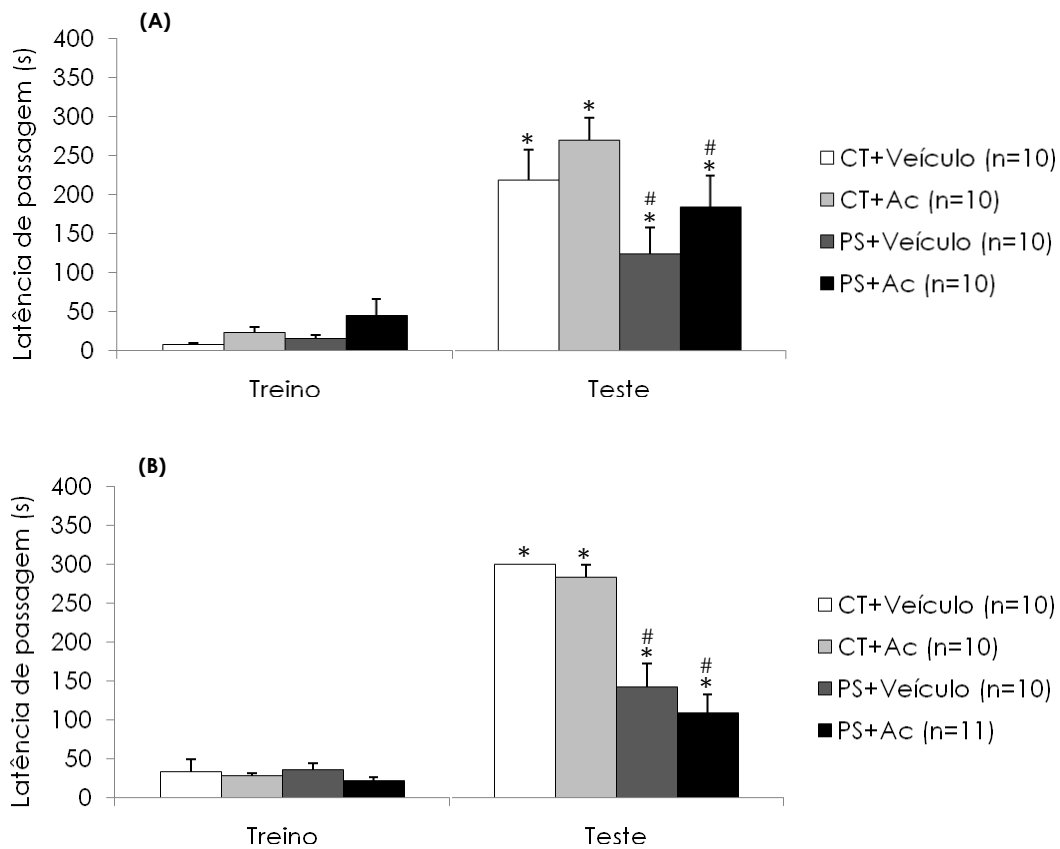


Figura 11 | Latências de passagem de animais controle (CT) e privados de sono (PS) na tarefa de esQUIVA inibitória após tratamento com veículo ou anticorpo anti-IL-6 (Ac) na dose de 2 µg/Kg. **(A)** Tratamento agudo com veículo ou anticorpo anti-IL-6 (*vs treino: CT+Veículo e CT+Ac $p \leq 0,001$; PS+Veículo $p \leq 0,006$; PS+Ac $p \leq 0,001$) (#vs respectivo grupo CT no teste: PS+Veículo $p \leq 0,029$; PS+Ac $p \leq 0,046$). **(B)** Tratamento crônico com veículo ou anticorpo anti-IL-6 (*vs treino: $p \leq 0,001$ para todos os grupos) (#vs respectivo grupo CT no teste: $p \leq 0,001$ para todos os grupos) (Média \pm Erro padrão).

5.2.2 | Peso corporal

Em ambos os tratamentos com o anticorpo anti-IL-6 a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo do grupo (Tratamento agudo: $F_{3,37}=3,320$ $p\leq 0,030$) (Tratamento crônico: $F_{3,34}=4,404$ $p\leq 0,010$), do tempo (Tratamento agudo: $F_{2,74}=210,929$ $p\leq 0,001$) (Tratamento crônico: $F_{5,170}=17,364$ $p\leq 0,001$), e da interação entre grupo e tempo (Tratamento agudo: $F_{6,74}=61,893$ $p\leq 0,001$) (Tratamento crônico: $F_{15,170}=11,542$ $p\leq 0,001$).

O teste *post-hoc* de Bonferroni para a interação evidenciou que na medida basal não houve diferença significativa entre o peso dos grupos. No experimento do tratamento agudo houve redução de peso significativa nos grupos privados de sono após 96 horas (PS+Veículo e PS+Ac $p\leq 0,001$), e, 24 horas após as administrações, os grupos controle e o grupo PS+Veículo apresentaram redução de peso significativa (CT+Veículo e CT+Ac $p\leq 0,001$, PS+Veículo $p\leq 0,002$). No tratamento crônico ambos os grupos privados de sono apresentaram redução significativa de peso em todos os momentos a partir de 48 horas de experimento, em comparação à medida basal ($p\leq 0,001$ para todos os momentos). Nestes momentos houve também redução significativa de peso em comparação ao momento 24h no grupo PS+Veículo (48h $p\leq 0,003$; 72h, 96h e RS $p\leq 0,001$). Porém, no grupo PS+Ac, somente o peso nos momentos 96h e PR foram significativamente diferentes do momento 24h (96h $p\leq 0,009$; PR $p\leq 0,03$) (Figura 12).

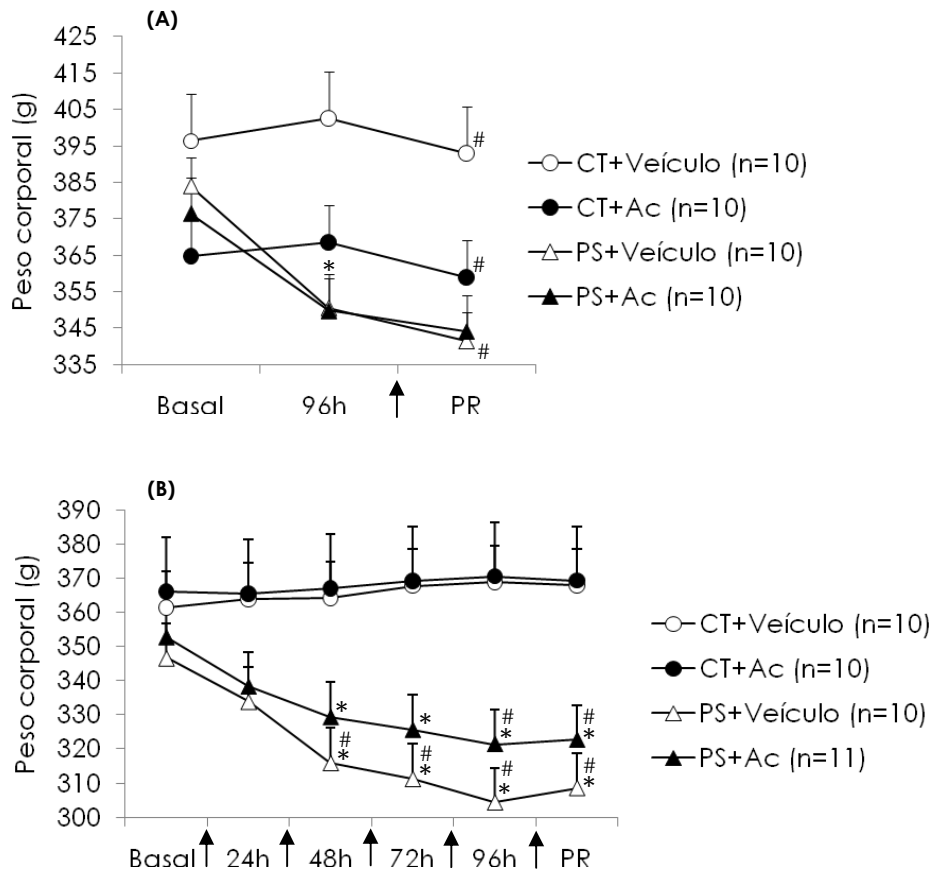


Figura 12 | Peso corporal de animais controle (CT) e privados de sono (PS) após tratamento com veículo ou anticorpo anti-IL-6 (Ac) na dose de 2 µg/Kg. Estão representados os pesos dos grupos no momento basal, durante e após as 96 horas de experimento, e após o período de recuperação (PR). As setas indicam os momentos das administrações. **(A)** Tratamento agudo com veículo ou anticorpo anti-IL-6 (*vs basal: PS+Veículo e PS+Ac $p \leq 0,001$) (#vs 96h: CT+Veículo e CT+Ac $p \leq 0,001$; PS+Veículo $p \leq 0,002$). **(B)** Tratamento crônico com veículo ou anticorpo anti-IL-6 (*vs basal: $p \leq 0,001$ para todos os momentos) (#vs 24h: PS+Veículo 48h $p \leq 0,003$; PS+Veículo 72h, 96h e PR $p \leq 0,001$; PS+Ac 96h $p \leq 0,009$; PS+Ac PR $p \leq 0,03$) (Média \pm Erro padrão).

6 | DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que a administração de LPS na dose de 75 µg/Kg (i.p.) atenuou o prejuízo de desempenho de ratos privados de sono na tarefa de esquiva inibitória. O tratamento com o Ac anti-IL-6 não alterou o desempenho dos animais na tarefa, porém, atenuou a perda de peso dos grupos privados de sono.

Sabe-se que o prejuízo de memória é um dos efeitos comportamentais clássicos da privação de sono (Bueno *et al.*, 1994; Smith & Rose, 1996; Dametto *et al.*, 2002; Graves *et al.*, 2003). No presente trabalho, ratos privados de sono durante 96 horas pelo método das plataformas múltiplas apresentaram prejuízo de desempenho na tarefa de esquiva inibitória, resultado que corrobora com dados da literatura (Bueno *et al.*, 1994; Dametto *et al.*, 2002). Os mecanismos responsáveis pelo efeito amnésico da privação de sono ainda precisam ser esclarecidos, e dados indicam um possível envolvimento de mediadores inflamatórios. A privação de sono induz a alteração de vários parâmetros imunológicos (Irwin, 2002; Bryant *et al.*, 2004; Everson, 2005), e trabalhos já evidenciaram que mediadores inflamatórios alterados pela privação de sono também participam de processos cognitivos como, por exemplo, a memória (Maier & Watkins, 1998; Wilson *et al.*, 2002; McAfoose & Baune, 2009). No presente trabalho, a administração de LPS na dose de 75 µg/Kg teve a propriedade de melhorar o desempenho de animais privados de sono na tarefa de esquiva inibitória, quando comparados aos animais privados de sono tratados com veículo. Sugerimos três

possíveis mecanismos para explicar tal efeito: (1) Dadas as administrações de LPS empregadas no presente trabalho, e as evidências da participação do sistema imunológico em processos cognitivos (Maier & Watkins, 1998; Wilson *et al.*, 2002; McAfoose & Baune, 2009), é possível que a secreção de mediadores inflamatórios induzida pela administração de LPS tenha atuado diretamente na melhora do desempenho dos animais. Estudos realizados com humanos fortalecem esta hipótese: em um trabalho recente, Benedict *et al.* (2009) evidenciaram que administrações nasais de uma solução de IL-6 favorecem a consolidação de memórias emocionais. Tal resultado indica a possível participação deste mediador inflamatório em processos de consolidação de memória. (2) A necessidade do sono para a consolidação de memórias já é bem estabelecida na literatura (Maquet, 2001; Diekelmann & Born, 2010). Sabe-se também que determinados mediadores inflamatórios atuam na regulação homeostática do sono (Opp, 2005; Krueger *et al.*, 2007), e que a administração desses mediadores ou de substâncias que induzem sua secreção, como é o caso do LPS, provoca aumento de sono NREM (ou sono de ondas lentas) e supressão do REM (ou sono paradoxal) (Majde & Kruger, 2005; Imeri & Opp, 2009). No presente trabalho, o LPS foi administrado em animais privados de sono, antes do período de recuperação de 24 horas. Neste período, os animais anteriormente submetidos à privação exibem redução de sono NREM e aumento de REM, fenômeno denominado de rebote de sono (Machado *et al.*, 2004). Dessa maneira, a somatória dos efeitos do LPS e do rebote de sono pode ter alterado a arquitetura do sono de uma maneira que tenha favorecido a consolidação de memórias relacionadas à tarefa. Porém, estudos empregando o registro de sono dos animais devem ser conduzidos para esclarecer tal efeito. (3) Dados de nosso laboratório indicam que

animais privados de sono, quando expostos a um estresse moderado logo após a privação, apresentam aumento de corticosterona (Suchecki *et al.*, 2002). O aumento deste hormônio também é observado após a administração de LPS, dada a sua capacidade de ativar o eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) (Linthorst *et al.*, 1995; Gibb *et al.*, 2008). Trabalhos também já evidenciaram que a administração de corticosterona ou dexametasona após o treino pode melhorar o desempenho nas tarefas de condicionamento de medo e esquiva inibitória (Rooszendaal & McGaugh, 1996; Medina *et al.*, 2007; Abrari *et al.*, 2009). Assim, o provável aumento de corticosterona provocado pela sessão de treino da tarefa de esquiva inibitória e pela administração de LPS pode ter facilitado a aquisição e/ou consolidação da tarefa nos animais privados de sono. Outro estudo de nosso laboratório mostrou ainda que a inibição da secreção de corticosterona não melhorou o desempenho dos animais privados de sono na tarefa de condicionamento de medo ao contexto, indicando que o aumento deste hormônio não é responsável pelo prejuízo de memória (Tiba *et al.*, 2008). Vale ressaltar ainda que a administração de LPS no grupo controle não alterou o desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória. Tal resultado demonstra que a dose de LPS utilizada foi moderada, porém não ineficaz, já que a redução de peso observada após a administração revela a atuação da droga.

Dentre as alterações imunológicas provocadas pela privação de sono, destaca-se a alteração da concentração de citocinas. Trabalhos com animais e que utilizaram a técnica de privação de sono por plataformas já relataram aumento periférico de citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo, da IL-6 (Hu *et al.*, 2003; Yehuda *et al.*, 2009). A IL-6, por sua vez, já foi relacionada a processos de aprendizagem e memória.

Braida *et al.* (2004) relataram que camundongos transgênicos que não expressam a IL-6 apresentam melhor desempenho na aquisição de uma tarefa em labirinto radial e redução do efeito amnésico da escopolamina, quando comparados com animais controle. Outros trabalhos mostraram ainda os efeitos da IL-6 sobre a LTP: Li *et al.*, (1997) mostraram que a IL-6 pode suprimir a indução da LTP, enquanto que Balschun *et al.* (2004) demonstraram que a neutralização da IL-6 fortalece a manutenção da LTP. Tais dados indicam um potencial envolvimento da IL-6 no prejuízo de memória. Porém, o bloqueio agudo e crônico da IL-6 neste trabalho não alterou o desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória. A ausência de efeito leva à interpretação de que a IL-6, sozinha, não é responsável pelas alterações de memória observadas após a privação de sono. Porém, não podemos descartar a atuação sinérgica da IL-6 com outras citocinas, como, por exemplo, a IL-1 β e TNF- α , na promoção desse efeito (McAfoose & Baune, 2009). Deve-se levar em conta também a efetividade do bloqueio da IL-6. As doses de anticorpo adotadas no presente trabalho, apesar de embasadas na literatura, foram utilizadas em animais privados de sono. Tal manipulação nunca havia sido feita até o momento. Portanto, é possível que, neste caso, a dose de anticorpo tenha sido inferior à necessária para um bloqueio efetivo. Outro fator a ser considerado é a ausência de IL-6 a ser neutralizada, o que não descartaria a participação desta citocina no prejuízo de memória de animais privados de sono, já que trabalhos mostram também que a administração de IL-6 melhora a consolidação de determinados tipos de memória (Benedict *et al.*, 2009).

Dentre as alterações promovidas pelo LPS destaca-se a alteração do comportamento alimentar, e sabe-se que este efeito é mediado principalmente por

citocinas pró-inflamatórias (Plata-Salamán, 2001; Kelley *et al.*, 2003). Sabe-se que estas citocinas participam da regulação do metabolismo promovendo anorexia, aumento do catabolismo e perda de peso (Langhans & Hrupka, 1999; Matarese & La Cava, 2004). Estes efeitos podem ser eliciados pela ação direta das citocinas em determinadas áreas do sistema nervoso central. Por exemplo, já foram identificados RNAm da IL-6 e de seu receptor (IL-6R) em áreas cerebrais relacionadas ao consumo alimentar (Schöbitz *et al.*, 1992; Schöbitz *et al.*, 1993). Tais dados explicam a redução significativa de peso, em animais controle e privados de sono, observada 24 horas após as administrações de LPS que foram conduzidas no presente trabalho.

Estudos com humanos já evidenciaram que a privação de sono altera diversos parâmetros metabólicos e está relacionada ao aumento do risco de obesidade (Knutson *et al.*, 2007). Porém, em modelos animais, observa-se o oposto: animais privados de sono geralmente exibem redução do peso corporal (Koban & Swinson, 2005; Hipólido *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008), efeito também observado no presente estudo. Trabalhos que utilizaram a técnica de privação de sono por plataformas durante períodos relativamente curtos evidenciaram que esta redução de peso se deve principalmente a perda de tecido adiposo (Papakonstantinou *et al.*, 2003; Hipólido *et al.*, 2006). Tal efeito é provavelmente provocado pelo aumento da taxa metabólica (Koban & Swinson, 2005; Hipólido *et al.*, 2006), enquanto que o consumo alimentar se mantém inalterado (Martins *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008), resultando dessa maneira em um balanço energético negativo. Como dito anteriormente, as citocinas promovem anorexia, aumento do catabolismo, e perda de peso (Langhans & Hrupka, 1999; Plata-Salamán, 2001; Matarese & La Cava,

2004), e a privação de sono, assim como administrações de LPS, elevam a concentração de citocinas (Hu *et al.*, 2003; Yehuda *et al.*, 2009). Porém, o envolvimento das citocinas na redução de peso durante a privação de sono ainda não está claro. No presente trabalho, o tratamento agudo com anticorpo anti-IL-6 logo após a PS evitou a redução significativa de peso durante o período de recuperação, e o tratamento crônico com o mesmo anticorpo diariamente durante a PS resultou em uma atenuação da perda de peso, sugerindo a participação da IL-6 na promoção deste efeito. Dados de outros trabalhos fortalecem esta hipótese: o RNAm da IL-6 e de seu receptor já foram identificados nas regiões ventro e dorsomedial do hipotálamo (Schöbitz *et al.*, 1992; 1993), áreas relacionadas à regulação do consumo alimentar (Schwartz *et al.*, 2000); camundongos transgênicos que não expressam a IL-6 apresentam perda de peso atenuada após a administração de LPS, quando comparados com animais controle (Bluthé *et al.*, 2000); e a administração de soro ou de um anticorpo monoclonal anti-IL-6 antes da administração periférica de LPS se mostraram eficientes em atenuar a redução do consumo alimentar e perda de peso, respectivamente, promovidas pelo LPS (Strassmann *et al.*, 1993; Harden *et al.*, 2006).

A melhora de desempenho dos animais privados de sono na tarefa de esQUIVA inibitória após a administração de LPS provavelmente é resultado da atuação conjunta dos sistemas nervoso, imunológico e endócrino, e este resultado evidencia o possível envolvimento de mediadores inflamatórios nas alterações de memória observadas após a PS. A atuação isolada da IL-6 aparentemente não está relacionada ao prejuízo de memória observado após a PS, já que a administração de um anticorpo anti-IL-6 não alterou o desempenho dos animais no teste comportamental. Porém, os

resultados indicam que este mediador inflamatório participa na promoção da redução de peso durante a PS. Dadas as características de atuação das citocinas, é muito provável que as alterações resultantes da privação de sono envolvam a ação de outros mediadores inflamatórios.

7 | CONCLUSÕES

1. Mediadores inflamatórios estão envolvidos no prejuízo de memória resultante da privação de sono, já que a administração de LPS (75 µg/Kg, i.p.) teve a propriedade de atenuar o prejuízo de desempenho de ratos privados de sono na tarefa de esquiva inibitória;
2. O tratamento com o anticorpo anti-IL-6, não alterou o desempenho na tarefa da esquiva inibitória em ratos privados de sono, sugerindo que a IL-6, neste caso, não participa no déficit de memória;
3. A citocina IL-6 possivelmente participa da promoção da redução de peso durante a privação de sono em ratos, pois o bloqueio de sua atividade biológica pela administração de um anticorpo atenuou a perda de peso dos animais privados de sono.

8 | REFERÊNCIAS

- Aloia, M.S.; Arnedt, J.T.; Davis, J.D.; Riggs, R.L.; Byrd, D.; 2004.** Neuropsychological sequelae of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: A critical review. *Journal of the International Neuropsychological Society*. 10(5):772-85.
- Andersen, M.L.; Martins, P.J.F.; D'Almeida, V.; Bigotto, M.; Tufik, S.; 2005.** Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *Journal of Sleep Research*. 14(1):83-90.
- Ayas, N.T.; White, D.P.; Manson, J.E.; Stampfer, M.J.; Speizer, F.E.; Malhotra, A.; Hu, F.B.; 2003.** A prospective study of sleep duration and coronary heart disease in women. *Archives of Internal Medicine*. 163(2):205-9.
- Baier, P.C.; May, U.; Scheller, J.; Rose-John, S.; Schiffelholz, T.; 2009.** Impaired hippocampus-dependent and -independent learning in IL-6 deficient mice. *Behavioural Brain Research*. 200(1):192-6.
- Balschun, D.; Wetzel, W.; Del Rey, A.; Pitossi, F.; Schneider, H.; Zuschratter, W.; Besedovsky, H.O.; 2004.** Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB Journal*. 18(14):1788-90.
- Benedict, C.; Scheller, J.; Rose-John, S.; Born, J.; Marshall, L.; 2009.** Enhancing influence of intranasal interleukin-6 on slow-wave activity and memory consolidation during sleep. *FASEB Journal*. 23(10):3629-36.
- Braida, D.; Sacerdote, P.; Panerai, A.E.; Bianchi, M.; Aloisi, A.M.; Iosue, S.; Sala, M.; 2004.** Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice. *Behavioural Brain Research*. 153(2):423-9.
- Bruel-Jungerman, E.; Laroche, S.; Rampon, C.; 2005.** New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*. 21(2):513-21.
- Bryant, P.A.; Trinder, J.; Curtis, N.; 2004.** Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system? *Nature Reviews Immunology*. 4(6):457-67.
- Bueno, O.F.; Lobo, L.L.; Oliveira, M.G.; Gugliano, E.B.; Pomarico, A.C.; Tufik, S.; 1994.** Dissociated paradoxical sleep deprivation effects on inhibitory avoidance and conditioned fear. *Physiology & Behavior*. 56(4):775-9.
- Bueno, O.F.A.; Oliveira, M.G.M.; Lobo, L.L.; Morais, P.R.; Melo, F.H.M.; Tufik, S.; 2000.** Cholinergic modulation of inhibitory avoidance impairment induced by paradoxical sleep deprivation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 24(4):595-606.
- Cohen, H.B.; Dement, W.C.; 1965.** Changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of paradoxical phase. *Science*. 150(3701):1318-&.
- Connor, T.J.; Leonard, B.E.; 1998.** Depression, stress and immunological activation: The role of cytokines in depressive disorders. *Life Sciences*. 62(7):583-606.

- Dametto, M.; Suchecki, D.; Bueno, O.F.; Moreira, K.M.; Tufik, S.; Oliveira, M.G.; 2002.** Social stress does not interact with paradoxical sleep deprivation-induced memory impairment. *Behavioural Brain Research*. 129(1-2):171-8.
- Dantzer, R.; Konsman, J.P.; Bluthè, R.M.; Kelley, K.W.; 2000.** Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical*. 85(1-3):60-5.
- Dantzer, R.; O'Connor, J.C.; Freund, G.G.; Johnson, R.W.; Kelley, K.W.; 2008.** From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*. 9(1):46-56.
- De Koninck J; Lorrain D; Christ G; Proulx G; Coulombe D; 1989.** Intensive language-learning and increases in rapid eye-movement sleep – Evidence of a performance-factor. *International Journal of Psychophysiology*. 8(1):43-7.
- De Manacéine, M.; 1894.** Quelques observations expérimentales sur l'influence de l'insomnie absolue. *Archives Italiennes de Biologie*. 21:322-5.
- Diekelmann, S.; Born, J.; 2010.** The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*. 11(2):114-26.
- Drapeau, E.; Mayo, W.; Arousseau, C.; Le Moal, M.; Piazza, P.V.; Abrous, D.N.; 2003.** Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(24):14385-90.
- Dubiela, F.P.; Oliveira, M.G.; Moreira, K.D.; Nobrega, J.N.; Tufik, S.; Hipolide, D.C.; 2005.** Learning deficits induced by sleep deprivation and recovery are not associated with altered [(3)H]muscimol and [(3)H]flunitrazepam binding. *Brain Research*. 1037(1-2):157-63.
- Dubiela, F.P.; Oliveira, M.G.M.; Moreira, K.M.; Nobrega, J.N.; Tufik, S.; Hipolide, D.C.; 2010.** Inverse benzodiazepine agonist β -CCM does not reverse learning deficit induced by sleep deprivation. *Neuroscience Letters*. 469(1):169-73.
- Dudai, Y.; 2004.** The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*. 55:51-86.
- Everson, C.A.; 2005.** Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 289(4):R1054-63.
- Frey, D.J.; Fleshner, M.; Wright, K.P.; 2007.** The effects of 40 hours of total sleep deprivation on inflammatory markers in healthy young adults. *Brain, Behavior, and Immunity*. 21:1050-7.
- Gadient, R.A.; Offen, U.; 1995.** Interleukin-6 and interleukin-6 receptor mRNA expression in rat central nervous system. In: Mackiewicz A, Koj A, Sehgal PB, editors. *Interleukin-6 Type Cytokines*. New York: New York Acad Sciences; 1995. p. 403-6.
- Glaser, R.; Rice, J.; Sheridan, J.; Fertel, R.; Stout, J.; Speicher, C.; Pinsky, D.; Kotur, M.; Post, A.; Beck, M.; Kiecolt-Glaser, J.A.; 1987.** Stress-related immune suppression – Health implications. *Brain, Behavior and Immunity*. 1,7–20.
- Goehler, L.; Gaykema, R.; 2007.** Immune signaling to brain - Mechanisms and potential pathways influencing sleep. In Pandi-Perumal, S.R.; Cardinali, D.P.; Chrousos, G.P.; 2007. *Neuroimmunology of sleep*. Springer. New York, USA.

- Gorczynski, R.; Stanley, S.; 1999.** Clinical immunology – An introductory text. Landes Bioscience. Texas, USA.
- Gottlieb, D.J.; Punjabi, N.M.; Newman, A.B.; Resnick, H.E.; Redline, S.; Baldwin, C.M.; Nieto, F.J.; 2005.** Association of sleep time with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Archives of Internal Medicine*. 165(8):863-8.
- Graves, L.A.; Heller, E.A.; Pack, A.I.; Abel, T.; 2003.** Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learning & Memory*. 10(3):168-76.
- Haack, M.; Kraus, T.; Schuld, A.; Dalal, M.; Koethe, D.; Pollmacher, T.; 2002.** Diurnal variations of interleukin-6 plasma levels are confounded by blood drawing procedures. *Psychoneuroendocrinology*. 27(8):921-31.
- Hasler, G.; Buysse, D.J.; Klaghofer, R.; Gamma, A.; Ajdacic, V.; Eich, D.; Rössler, W.; Angst, J.; 2004.** The association between short sleep duration and obesity in young adults: A 13-year prospective study. *Sleep*. 27(4):661-6.
- Hennevin, E.; Leconte, P.; 1977.** Study of relations between paradoxical sleep and learning processes. *Physiology & Behavior*. 18(2):307-19.
- Hennevin, E.; Hars, B.; Maho, C.; Bloch, V.; 1995.** Processing of learned information in paradoxical sleep – Relevance for memory. *Behavioural Brain Research*. 69(1-2):125-35.
- Hipólido, D.C.; Suchecki, D.; Pinto, A.P.D.; Faria, E.C.; Tufik, S.; 2006.** Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: Effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 18(4):231-8.
- Hogan, D.; Morrow, J.D.; Smith, E.M.; Opp, M.R.; 2003.** Interleukin-6 alters sleep of rats. *Journal of Neuroimmunology*. 137(1-2):59-66.
- Hu, J.; Chen, Z.; Gorczynski, C.P.; Gorczynski, L.Y.; Kai, Y.; Lee, L.; Manuel, J.; Gorczynski, R.M.; 2003.** Sleep-deprived mice show altered cytokine production manifest by perturbations in serum IL-1ra, TNF α , and IL-6 levels. *Brain, Behavior, and Immunity*. 17(6):498-504.
- Imeri, L.; Opp, M.R.; 2009.** How (and why) the immune system makes us sleep. *Nature Reviews Neuroscience*. 10(3):199-210.
- Irwin, M.; 2002.** Effects of sleep and sleep loss on immunity and cytokines. *Brain, Behavior and Immunity*. 16(5):503-12.
- Ishimori, K.; 1909.** True cause of sleep: a hypnogenic substance as evidenced in the brain of sleep-deprived animals. *Tokyo Igakkai Zasshi*. 23,429-457.
- Jouvet, D.; Jouvet, M.; Vimont, P.; Delorme, F.; 1964.** Etude de la privation selective de la phase paradoxale de sommeil le chat. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*. 158(4):756-&.
- Knutson, K.L.; Spiegel, K.; Penev, P.; Van Cauter, E.; 2007.** The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Medicine Reviews*. 11(3):163-78.

- Koban, M.; Swinson, K.L.; 2006.** Chronic REM-sleep deprivation of rats elevates metabolic rate and increases UCP1 gene expression in brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 289(1):E68-E74.
- Konsman, J.P.; Parnet, P.; Dantzer, R.; 2002.** Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends in Neurosciences*. 25(3):154-9.
- Korte, S.M.; 2001.** Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 25(2):117-42.
- Krueger, J.M.; Dinarello, C.A.; Chedid, L.; 1983.** Promotion of slow-wave sleep (SWS) by a purified interleukin-1 (IL-1) preparation. *Federat. Proc.* 42, 356.
- Krueger, J.M.; Rector, D.M.; Churchill, L.; 2005.** Sleep and cytokines. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. 2(2):161-9.
- Landis, C.A.; Bergmann, B.M.; Ismail, M.M.; Rechtschaffen, A.; 1992.** Sleep deprivation in the rat XV. Ambient temperature choice in paradoxical sleep-deprived rats. *Sleep*. 15(1):13-20.
- Langhans, W.; Hrupka, B.; 1999.** Interleukins and tumor necrosis factor as inhibitors of food intake. *Neuropeptides*. 33(5):415-24.
- Legendre, R.; Piéron, H.; 1913.** Recherches sur le besoin de sommeil consecutif a une veille prolongee. *Z. Allgem. Physiol.* 14, 235-262.
- Li, A.J.; Katafuchi, T.; Oda, S.; Hori, T.; Oomura, Y.; 1997.** Interleukin-6 inhibits long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Research*. 748(1-2):30-8.
- Licinio, J.; Kling, M.A.; Hauser, P.; 1998.** Cytokines and brain function: Relevance to interferon-alpha-induced mood and cognitive changes. *Seminars in Oncology*. 25(1):30-8.
- Lockey, A.J.; Kavaliers, M.; Ossenkopp, K.P.; 2009.** Lipopolysaccharide reduces tactile startle response magnitude but not prepulse inhibition in rats: A dose-response examination. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 93(1):47-53.
- Lucero, M.A.; 1970.** Lengthening of REM sleep duration consecutive to learning in rat. *Brain Research*. 20(2):319-&.
- Machado, R.B.; Hipolide, D.C.; Benedito-Silva, A.A.; Tufik, S.; 2004.** Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Research*. 1004(1-2):45-51.
- Maier, S.F.; Watkins, L.R.; 1998.** Cytokines for psychologists: Implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychological Review*. 105(1):83-107.
- Maier, S.F.; Watkins, L.R.; 1999.** Bidirectional communication between the brain and the immune system: implications for behaviour. *Animal Behaviour*. 57:741-51.
- Maier, S.F.; 2003.** Bi-directional immune-brain communication: Implications for understanding stress, pain, and cognition. *Brain, Behavior, and Immunity*. 17(2):69-85.

- Mandai, O.; Guerrien, A.; Sockeel, P.; Dujardin, K.; Leconte, P.; 1989.** REM-sleep modifications following a morse code learning session in humans. *Physiology & Behavior*. 46(4):639-42.
- Maquet, P.; 2001.** The role of sleep in learning and memory. *Science*. 294(5544):1048-52.
- Martins, P.J.F.; D'Almeida, V.; Nobrega, J.N.; Tufik, S.; 2006.** A reassessment of the hyperphagia/weight-loss paradox during sleep deprivation. *Sleep*. 29(9):1233-8.
- Martins, P.J.F.; Nobrega, J.N.; Tufik, S.; D'Almeida, V.; 2008.** Sleep deprivation-induced gnawing - relationship to changes in feeding behavior in rats. *Physiology & Behavior*. 93(1-2):229-34.
- Matarese, G.; La Cava, A.; 2004.** The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends in Immunology*. 25(4):193-200.
- May, U.; Schifflholz, T.; Baier, P.C.; Krueger, J.M.; Rose-John, S.; Scheller, J.; 2009.** IL-6-trans-signalling increases rapid-eye-movement sleep in rats. *European Journal of Pharmacology*. 613(1-3):141-5.
- McAfoose, J.; Baune, B.T.; 2009.** Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 33(3):355-66.
- Mills, P.J.; Dimsdale, J.E.; 2004.** Sleep apnea: a model for studying cytokines, sleep, and sleep disruption. *Brain, Behavior, and Immunity*. 18(4):298-303.
- Monje, M.L.; Toda, H.; Palmer, T.D.; 2003.** Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 302(5651):1760-5.
- Moreira, K.M.; Hipolide, D.C.; Nobrega, J.N.; Bueno, O.F.A.; Tufik, S.; Oliveira, M.G.M.; 2003.** Deficits in avoidance responding after paradoxical sleep deprivation are not associated with altered H-3 pirenzepine binding to M1 muscarinic receptors in rat brain. *Brain Research*. 977(1):31-7.
- Mullington, J.; Korth, C.; Hermann, D.M.; Orth, A.; Galanos, C.; Holsboer, F.; Pollmacher, T.; 2000.** Dose-dependent effects of endotoxin on human sleep. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 278(4):R947-R55.
- Opp, M.R.; 2005.** Cytokines and sleep. *Sleep Medicine Reviews*. 9(5):355-64.
- Palmblad, J.; Petrini, B.; Wasserman, J.; Akerstedt, T.; 1979.** Lymphocyte and granulocyte reactions during sleep deprivation. *Psychosomatic Medicine*. 1979;41(4):273-8.
- Papakonstantinou, E.; Ryan, D.H.; Harris, R.B.S.; 2003.** Dietary fish oil does not protect rats exposed to restraint or sleep deprivation stress. *Physiology & Behavior*. 78(4-5):759-65.
- Peigneux, P.; Laureys, S.; Fuchs, S.; Collette, F.; Perrin, F.; Reggers, J.; Phillips, C.; Degueldre, C.; Del Fiore, G.; Aerts, J.; Luxen, A.; Maquet, P.; 2004.** Are spatial memories strengthened in the human hippocampus during slow wave sleep? *Neuron*. 44(3):535-45.

- Pires, M.L.N.; Benedito-Silva, A.A.; Mello, M.T.; Del Giglio, S.; Pompeia, C.; Tufik, S.; 2007.** Sleep habits and complaints of adults in the city of Sao Paulo, Brazil, in 1987 and 1995. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40(11):1505-15.
- Plata-Salamán, C.; 2001.** Cytokines and feeding. *International Journal of Obesity*. 25:S48-S52.
- Ransohoff, R.M.; Benveniste, E.N.; 2006.** Cytokines and the CNS. CRC Press. Segunda edição. Florida, USA.
- Rechtschaffen, A.; Bergmann, B.M.; 2002.** Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep*. 25(1):18-24.
- Saxe, M.D.; Malleret, G.; Vronskaya, S.; Mendez, I.; Garcia, A.D.; Sofroniew, M.V.; Kandel, E.R.; Hen, R.; 2007.** Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(11):4642-6.
- Schöbitz, B.; Voorhuis, D.A.; De Kloet, E.R.; 1992.** Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Letters*. 136(2):189-92.
- Schöbitz, B.; Dekloet, E.R.; Sutanto, W.; Holsboer, F.; 1993.** Cellular-localization of interleukin-6 messenger-RNA and interleukin-6 receptor messenger-RNA in rat brain. *European Journal of Neuroscience*. 5(11):1426-35.
- Shors, T.J.; Townsend, D.A.; Zhao, M.R.; Kozorovitskiy, Y.; Gould, E.; 2002.** Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*. 12(5):578-84.
- Silva, R.H.; Abilio, V.C.; Takatsu, A.L.; Kameda, S.R.; Grassl, C.; Chehin, A.B.; Medrano, W.A.; Calzavara, M.B.; Registro, S.; Andersen, M. L.; Machado, R.B.; Carvalho, R.C.; Ribeiro, R.A.; Tufik, S.; Frussa-Filho, R.; 2004.** Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology*. 46(6):895-903.
- Skinner, G.W.; Mitchell, D.; Harden, L.M.; 2009.** Avoidance of physical activity is a sensitive indicator of illness. *Physiology & Behavior*. 96(3):421-7.
- Smith, C.; Young, J.; Young, W.; 1980.** Prolonged increases in paradoxical sleep during and after avoidance-task acquisition. *Sleep*. 3(1):67-81.
- Smith, C.; Rose, G.; 1996.** Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. *Physiology & Behavior*. 59(1):93-7.
- Smith, C.; Wilson, N.W.; Louw, A.; Myburgh, K.H.; 2007.** Illuminating the interrelated immune and endocrine adaptations after multiple exposures to short immobilization stress by in vivo blocking of IL-6. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 292(4):R1439-47.
- Späth-Schwalbe, E.; Hansen, K.; Schmidt, F.; Schrezenmeier, H.; Marshall, L.; Burger, K.; Fehm, H.L.; Born, J.; 1998.** Acute effects of recombinant human interleukin-6 on endocrine and central nervous sleep functions in healthy men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 83(5):1573-9.
- Spiegel, K.; Leproult, R.; Van Cauter, E.; 1999.** Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet*. 354(9188):1435-9.

- Spiegel, K.; Sheridan, J.F.; Van Cauter, E.; 2002.** Effect of sleep deprivation on response to immunization. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 288(12):1471-2.
- Stickgold, R.; 2005.** Sleep-dependent memory consolidation. *Nature*. 437(7063):1272-8.
- Suchecki, D.; Tufik, S.; 2000.** Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiology & Behavior*. 68(3):309-16.
- Suchecki, D.; Tiba, P.A.; Tufik, S.; 2002.** Paradoxical sleep deprivation facilitates subsequent corticosterone response to a mild stressor in rats. *Neuroscience Letters*. 320(1-2):45-8.
- Sutherland, G.R.; McNaughton, B.; 2000.** Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Current Opinion in Neurobiology*. 10(2):180-6.
- Taheri, S.; Lin, L.; Austin, D.; Young, T.; Mignot, E.; 2004.** Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *Plos Medicine*. 1(3):210-7.
- Tiba, P.A.; Oliveira, M.G.M.; Rossi, V.C.; Tufik, S.; Suchecki, D.; 2008.** Glucocorticoids are not responsible for paradoxical sleep deprivation-induced memory impairments. *Sleep*. 31(4):505-15.
- Toth, L.A.; Krueger, J.M.; 1988.** Alteration of sleep in rabbits by *Staphylococcus aureus* infection. *Infection and Immunity*. 56(7):1785-91.
- Tufik, S.; Santos-Silva, R.; Taddei, J.A.; Bittencourt, L.R.A.; 2010.** Obstructive Sleep Apnea Syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Medicine*. 11(5):441-6.
- Vallieres, L.; Campbell, I.L.; Gage, F.H.; Sawchenko, P.E.; 2002.** Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *Journal of Neuroscience*. 22(2):486-92.
- Vgontzas, A.N.; Zoumakis, M.; Bixler, E.O.; Lin, H.M.; Prolo, P.; Vela-Bueno, A.; Kales, A.; Chrousos, G.P.; 2003.** Impaired nighttime sleep in healthy old versus young adults is associated with elevated plasma interleukin-6 and cortisol levels: physiologic and therapeutic implications. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 88(5):2087-95.
- Vgontzas, A.N.; Zoumakis, E.; Bixler, E.O.; Lin, H.M.; Follett, H.; Kales, A.; Chrousos, G.P.; 2004.** Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89(5):2119-26.
- Vitkovic, L.; Bockaert, J.; Jacque, C.; 2000.** "Inflammatory" cytokines: Neuromodulators in normal brain? *Journal of Neurochemistry*. 74(2):457-71.
- Vitkovic, L.; Konsman, J.P.; Bockaert, J.; Dantzer, R.; Homburger, V.; Jacque, C.; 2000.** Cytokine signals propagate through the brain. *Molecular Psychiatry*. 5(6):604-15.
- White, N.M.; McDonald, R.J.; 2002.** Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*. 77(2):125-84.

- Wilson, C.J.; Finch, C.E.; Cohen, H.J.; 2002.** Cytokines and cognition - The case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *Journal of the American Geriatrics Society*. 50(12):2041-56.
- Wilson, M.A.; McNaughton, B.L.; 1994.** Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science*. 265(5172):676-9.
- Yehuda, S.; Sredni, B.; Carasso, R.L.; Kenigsbuch-Sredni, D.; 2009.** REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 29(7):393-8.
- Zhao, M.; Chen, J.B.; Wang, W.Y.; Wang, L.; Ma, L.; Shen, H.; Li, M.; 2008.** Psychological stress induces hypoferrremia through the IL-6-hepcidin axis in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 373(1):90-3.