

**ADRIANO ZAGER**

**EFEITOS DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL  
NA RESPOSTA AO LIPOPOLISSACARÍDEO  
BACTERIANO: ASPECTOS IMUNOLÓGICOS,  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM  
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do título de  
mestre em Ciência.

**São Paulo**

**2009**

**ADRIANO ZAGER**

**EFEITOS DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL  
NA RESPOSTA AO LIPOPOLISSACARÍDEO  
BACTERIANO: ASPECTOS IMUNOLÓGICOS,  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM  
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do título de  
mestre em Ciência.

Orientadora: Monica Levy Andersen

Co-orientador: Sergio Tufik

**São Paulo**

**2009**

Zager, Adriano

**Efeitos da Privação de Sono Paradoxal na Resposta ao Lipopolissacarídeo Bacteriano:** Aspectos Imunológicos, Comportamentais e Neuroquímicos em Camundongos/ Adriano Zager -- São Paulo, 2009.

xiv, 94p.

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

**Título em inglês:** Effects of Paradoxical Sleep Deprivation on Response to Lipopolyssacharide: Immunological, Behavioral and Neurochemical Aspects in Mice

1. Sono; 2. Sistema Imunológico; 3. Lipopolissacarídeo; 4. Comportamento Doentio.

**ADRIANO ZAGER**

**EFEITOS DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL  
NA RESPOSTA AO LIPOPOLISSACARÍDEO  
BACTERIANO: ASPECTOS IMUNOLÓGICOS,  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM  
CAMUNDONGOS**

**Banca examinadora**

Prof. Dr. João Palermo Neto

Prof. Dr. Katsumasa Hoshino

Prof. Dra. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital

**Suplente:**

Prof. Dr. Roberto Frussa Filho

**Aprovada em: abril/2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA**

Chefe do Departamento:

Profa. Dra. Maria Lucia Oliveira de Souza Formigoni

Coordenadora do Curso de Pós-graduação:

Profa. Dra. Maria Gabriela Menezes de Oliveira

*Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina no período de maio/07 a março/09, com apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processos 06/58275-1 e 98/14303-3 (CEPID).*

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”*

**Albert Einstein**

*“Se vi mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes”*

**Sir Isaac Newton**

## Agradecimentos

É um trabalho enorme agradecer a todos os gigantes que um dia ofereceram seus ombros, porém alguns deles não podem ser esquecidos ao término de mais essa fase de minha vida. Um agradecimento especial:

- Aos meus orientadores Monica Andersen e Sergio Tufik, pela oportunidade única de iniciar a minha vida científica, por todos os ensinamentos deixados e pelo voto de confiança durante a realização desse trabalho;

- À toda minha família e amigos, pelo entusiasmo e apoio incondicional em qualquer decisão que tomei e durante todo o meu mestrado, me ajudando de todas as formas possíveis para a conclusão dessa jornada;

- Às colegas de sala Francieli Ruiz, Raquel Martins e Fernanda Armani, por todos os momentos descontraídos durante o trabalho e por tornar nossa convivência tão agradável ao longo do tempo, mesmo nos momentos mais difíceis;

- Às colegas de grupo Andressa da Silva, Isabela Antunes, Tathiana Alvarenga, Vanessa Kahan, Tereza Schutz, Neuli Tenório, Ligia Papale e Paula Araújo, pelo convívio diário e ajuda durante todas as etapas;

- Aos amigos do departamento André Andrade, Karina Abrahão, Aline Soeiro, Fernanda Soncini, Juliana Carlota, Bruno de Brito, Tharcila Chaves, Gabriela Fujisaka, Daniel de Santi, Ricardo Mazzeo, Adriana Neves, Bruna del Vecchio, Danyela Pereira, Thiago Pavin, Tatiana Amato, Lyvia Freire, Graziela Molska e

Juliane Borges pela companhia e por tornar o ambiente de trabalho tão divertido e agradável;

- Aos amigos Marcelo Lima e Angela Reksidler, pelo empenho, amizade e todas as lições científicas e humanas que se tornaram fundamentais para a minha formação;

- A todos os funcionários do departamento de Psicobiologia, em especial Marilde Aires, Waldermaks Leite (Dunga), Alice Lima, Ricardo Marques, Ivan Xavier, Cristiano Resende, Diva Lima e Solange Fagundes, pela ajuda indispensável durante toda a realização desse trabalho e por todos os momentos divertidos durante o cafezinho;

- Aos amigos Ricardo Machado, Ricardo Lazzarini, Fúlvio Mendes e Alberto Yin, pela parceria e apoio fundamentais;

- Às funcionárias da AFIP Magda Bignoto e Renata Zeigler e ao companheiro André Bachi pela ajuda durante todas as etapas desse trabalho.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
1.1 SONO – ASPECTOS GERAIS	2
1.2 PADRÃO DE SONO EM ROEDORES	4
1.3 SONO NA SOCIEDADE MODERNA	6
1.4 INTERAÇÃO SONO E SISTEMA IMUNOLÓGICO	8
1.5 PRIVAÇÃO DE SONO E ALTERAÇÕES NA FUNÇÃO IMUNOLÓGICA	10
1.6 EXPOSIÇÃO AO LIPOPOLISSACARÍDEO E ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM RESPOSTA À INFECÇÃO	12
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
4.1 ANIMAIS	16
4.2 DROGAS	16
4.3 PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL (PSP)	17
4.4 PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES DO LAVADO PERITONEAL, BAÇO E LINFONODO	17
4.5 MARCAÇÃO DAS CÉLULAS E AVALIAÇÃO DOS SUBTIPOS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO	18
4.6 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	19
4.7 CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NA CORRENTE SANGUÍNEA	19
4.8 CAMPO ABERTO	19
4.9 LABIRINTO EM CRUZ-ELEVADO	20
4.10 COLETA DE SANGUE E TECIDOS	21
4.11 CORTICOSTERONA	21
4.12 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE COX-2	22
4.13 AVALIAÇÃO DAS MONOAMINAS CENTRAIS	23
4.14 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E REGISTRO DE SONO	25
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
<b>5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS</b>	<b>27</b>
5.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO POR 72 HORAS NO PADRÃO DE SONO DE CAMUNDONGOS	27
5.1.1 <i>Sono de ondas lentas</i>	27
5.1.2 <i>Sono paradoxal</i>	27
5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM LPS	29
5.2.1 <i>Lavado peritoneal</i>	29
5.2.2 <i>Baço</i>	32
5.2.3 <i>Linfonodos</i>	34
5.2.4 <i>Contagem diferencial de leucócitos no sangue</i>	35
5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL NA RESPOSTA COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA AO LPS	37

5.3.1 Campo aberto .....	38
5.3.2 Labirinto em cruz-elevado .....	44
5.3.3 Corticosterona plasmática .....	46
5.3.4 Expressão de COX-2 no córtex e hipotálamo .....	47
5.3.5 Concentração de monoaminas e metabólitos no estriado.....	48
5.4 EXPERIMENTO 4: ASSOCIAÇÃO ENTRE A PSP E ADMINISTRAÇÃO DE LPS NA RECUPERAÇÃO DE SONO DE CAMUNDONGOS.....	55
5.4.1 Tempo total de sono.....	56
5.4.2 Sono de ondas lentas.....	57
5.4.3 Sono paradoxal .....	59
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
6.1 METODOLOGIA DE PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL EM CAMUNDONGOS .....	61
6.2 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS DECORRENTES DA PRIVAÇÃO DE SONO .....	62
6.3 PAPEL DO SONO NA RESPOSTA COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA AO LPS	63
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>80</b>

## RESUMO

O sono é um fenômeno biológico fundamental para a manutenção da saúde do organismo. No entanto, é cada vez maior o tempo que passamos acordados atualmente, devido às atividades interativas e pressões socioeconômicas exercidas pela sociedade. Além das conseqüências fisiológicas bem documentadas da privação de sono (PS), a interação do sono com o sistema imunológico, bem como a relação da PS com estímulos imunológicos específicos, permanece ainda inconclusiva. Assim, o objetivo do presente projeto foi investigar os efeitos da privação de sono paradoxal (PSP) na resposta imunológica e comportamental ao lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, um potente ativador imunológico, juntamente com alterações na neurotransmissão e expressão de proteínas inflamatórias no sistema nervoso central. Desta forma, camundongos C57BL/6J foram submetidos à PSP por 72 horas, sendo que os animais controles permaneceram em suas gaiolas moradia para manutenção do padrão de sono normal. Ao término da PSP, todos os animais receberam uma injeção de salina ou uma das doses de LPS e retornaram às suas gaiolas por um intervalo de 2 horas antes das análises imunológicas, comportamentais e neuroquímicas. Os resultados demonstram que a PSP foi capaz de provocar redução dos linfócitos na circulação sanguínea e no baço dos animais tratados com salina. Entretanto, outros sítios de migração de linfócitos (peritônio e linfonodos) não foram afetados, indicando que esses efeitos da PSP não são devido a alterações na migração celular. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos animais tratados com qualquer uma das doses de LPS. A PSP também foi capaz de aumentar a susceptibilidade aos efeitos comportamentais induzidos pela administração de

LPS, principalmente a imobilidade no teste de campo aberto. Ainda, as mudanças no padrão de sono provocadas pelo LPS inibiram o rebote de sono paradoxal, fenômeno presente em animais privados de sono. Essas alterações comportamentais refletem mudanças na neurotransmissão dopaminérgica no estriado e na expressão da proteína ciclooxygenase-2 no córtex desses animais. Assim, podemos concluir que o sono exerce um papel fundamental como modulador da resposta a um estímulo imunológico, através de alterações na resposta imunológica e comportamental. Nosso estudo fornece ainda novos achados sobre as bases fisiológicas da relação entre sono e o sistema imunológico.

## ABSTRACT

Sleep is a fundamental biologic phenomenon that is essential for the preservation of human health. Still, the time we spend awake is increasing ever more due to intense activities and the social and economic pressure exerted by society. Except for the well documented physiologic consequences of sleep deprivation (SD), the interaction sleep has with the immune system as well as the association of SD to specific immunologic stimuli remain inconclusive.

The aim of the current study was thus to investigate the effects of paradoxical sleep deprivation (PSD) in the immune and behavioral response to lipopolysaccharide (LPS) of *E. coli*, a powerful immunological activator, and alterations in neurotransmission and expression of inflammatory proteins within the central nervous system. For such, C57BL/6J mice were submitted to PSD for 72 hours while controls remained in their home-cages and maintained a normal sleep regimen. At the end of the PSD period all animals were administered a saline injection or one of the LPS doses and were returned to their respective cages for an interval of 2 hours before the immunologic, behavioral, and neurochemical analysis were performed. Results demonstrated that PSD was capable of causing a reduction of lymphocytes in the bloodstream and within spleen of the animals administered saline, but other lymphocyte migration sites (peritoneum and lymph nodes) were not affected indicating that such effects of PSD are not due to alteration of cellular migration. No significant difference was encountered in animals administered with whichever dose of LPS. PSD was also found to be capable of increasing susceptibility to the behavioral effects induced by LPS, particularly in the open field test. Furthermore, the alterations in the sleep pattern that were caused by LPS

inhibited paradoxical sleep rebound, a phenomenon that occurs in sleep deprived animals. Such behavioral alterations reflect changes in dopaminergic neurotransmission within the striatum and in the expression of cyclooxygenase-2 protein within the cortex of these animals. We can thus conclude that sleep exerts a fundamental role as a response modulator to an immune stimulus by altering the immune and behavioral response. Our study provides new findings about the physiological basis of the association between sleep and the immune system.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Sono – Aspectos gerais

O sono é um fenômeno biológico fundamental para a manutenção da saúde mental e emocional. Fisiologicamente, é considerado como um estado funcional, cíclico e reversível que está presente em todas as faixas etárias e na maioria das espécies animais. Possui algumas características comportamentais, como uma imobilidade relativa e o aumento do limiar de resposta aos estímulos externos. O organismo tem grande necessidade de manifestar o sono, e quando isso não se torna possível, pode ocorrer alterações marcantes e até mesmo morte após um período prolongado de privação de sono (PS) em animais (Rechtschaffen et al., 1989).

A compreensão moderna do sono originou-se dos primeiros registros da atividade elétrica cerebral em seres humanos denominados de eletroencefalograma (EEG), que permitiram a identificação de diferentes padrões durante o sono, e ainda proporcionaram uma riqueza de informações sobre os potenciais corticais relacionados com mudanças fisiológicas distintas em cada fase do sono. Muitas alterações eletroencefalográficas ocorrem no decorrer de uma noite de sono, indicando uma sucessão bem ordenada e cíclica de frequências de ondas nas fases de sono. Na primeira fase ocorre o sono de ondas lentas ou não-REM (NREM), caracterizado pela lentificação progressiva da atividade cortical com quatro estágios: estágio 1 (sonolência); estágio 2 (sono “leve”); estágio 3 e 4 (sono de ondas lentas propriamente dito). Esses estágios usualmente ocorrem em seqüência, frequentemente com flutuações ao longo da noite. A seguir, ocorre o sono REM (do inglês *Rapid Eye Movements*) que tem como principais características o movimento rápido dos

olhos e atonia muscular, além de ser o período em que ocorrem os sonhos (Aserinsky e Kleitman, 1953; Dement e Kleitman, 1957). O sono REM também é denominado sono paradoxal<sup>1</sup>, uma vez que o padrão eletroencefalográfico é semelhante ao da vigília, apesar da atonia muscular que sugere um sono profundo (Jouvet et al., 1964). Um ciclo de sono completo consiste de uma seqüência de sono NREM e REM, e cada ciclo tem duração em média de 90 a 110 minutos. Em geral, são observados de quatro a seis ciclos durante uma noite de sono. Os episódios de sono REM aumentam do primeiro ao último ciclo de sono e podem durar até uma hora no fim da noite.

---

<sup>1</sup> A nomenclatura sono paradoxal remete ao sono observado em animais enquanto que em humanos utiliza-se o termo sono REM.

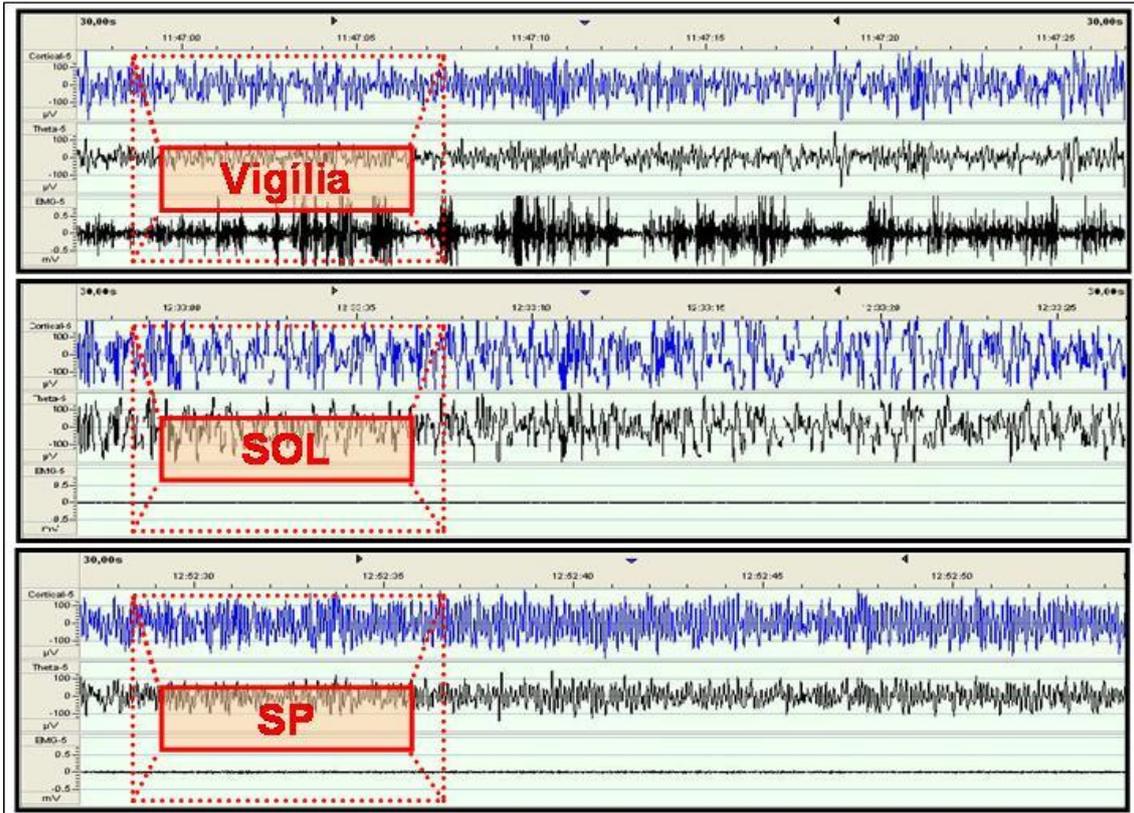
## 1.2 Padrão de sono em roedores

Na década de 70, foi realizada uma detalhada e minuciosa análise das várias fases do sono do rato. Este estudo revelou a existência de semelhanças com o sono humano muito maior do que se acreditava até então (Timmler et al., 1970). Hoje, graças às pesquisas tanto em seres humanos quanto em animais, sabemos que diferentes regiões do sistema nervoso central (SNC) apresentam oscilações elétricas que permitem distinguir diversas fases do sono e sua repetição cíclica em função do tempo.

Por se tratar de animais naturalmente predados em seu habitat natural, ratos e camundongos possuem um padrão de sono polifásico, caracterizado por um ciclo vigília-sono frequentemente irregular. Os primeiros ciclos são incompletos, mas depois se regularizam, terminando quase sempre com despertar breve, cuja duração em geral não passa de um segundo. Esse breve despertar parece ser característico de animais naturalmente predados (roedores), ao passo que os predadores (homem, gato, cão) raramente despertam entre um ciclo e outro, apresentando um padrão de sono monofásico. Entretanto, breves períodos de vigília ou pelo menos de forte superficialização do sono (microdespertares) também ocorrem em seres humanos. É possível que no rato esses curtos períodos de vigília tenham por finalidade explorar olfativamente o ambiente, a fim de identificar alguma eventual ameaça presente nas redondezas.

Os episódios de sono frequentemente concentram-se durante o período claro, enquanto que a vigília predomina no período escuro. Os roedores, em média, dormem cerca de 62% do período claro e 33% do período escuro, sendo que, durante a vigília, os animais realizam suas atividades vitais e

sociais (alimentação, procriação, interação social e exploração do ambiente). Somando-se os períodos de sono, verifica-se que os roedores dormem cerca de 50% das 24 horas, dividindo-se em sono de ondas lentas e sono paradoxal (Timo-laria et al., 1970).



**Figura 1:** Ilustração dos padrões de ondas característicos durante as fases do sono de roedores: vigília, sono de ondas lentas (SOL) e sono paradoxal (SP).

### 1.3 Sono na sociedade moderna

Atualmente ocorrem debates consideráveis sobre a necessidade diária de sono do homem moderno, e esse tema tem sido alvo de muitos estudos. Embora o sono ocupe aproximadamente um terço do nosso tempo de vida, é cada vez maior o tempo que passamos acordados atualmente. A prevalência dos distúrbios de sono está aumentando nas sociedades modernas. Nesse sentido, dados de um estudo epidemiológico de sono realizado recentemente na cidade de São Paulo demonstrou que a insônia afeta cerca de 16% das mulheres, enquanto que a síndrome da apnéia obstrutiva do sono afeta por volta de 32% da população masculina, comprovando a prevalência significativa de distúrbios de sono na população (Santos-Silva et al., 2009; Tufik et al., 2009).

Além dos distúrbios de sono que acometem boa parte da população geral, a exposição constante à luz artificial e às atividades interativas, como a televisão e a internet, combinam-se com as pressões socioeconômicas reduzindo o período de sono. A compreensão da fisiologia do sono e da vigília tem governado o interesse de numerosos estudiosos nas últimas décadas, fazendo com que a função do sono se destaque como uma área de investigação na comunidade científica, sendo que os efeitos de sua perda também caminham na mesma direção. Todavia, o entendimento global do impacto sobre a saúde e as condições clínicas em consequência da privação de sono permanece ainda amplamente desconhecido.

No modo de vida atual, a maior parte da PS ocorre na fase sono paradoxal/REM, na segunda metade da noite. Assim, muitos investigadores desenvolveram e empregam diferentes metodologias na redução ou abolição

do sono paradoxal; portanto, muitos dos estudos sobre a privação do sono enfocam a privação de sono paradoxal (PSP). Além disso, na tentativa de mimetizar as condições de PS crônica da sociedade, recentemente foram desenvolvidos diferentes protocolos que visam empregar restrição crônica de sono, em que indivíduos ou animais têm seu sono monitorado e restrito por longos períodos (Machado et al., 2005; Kim et al., 2007; Martins et al., 2009).

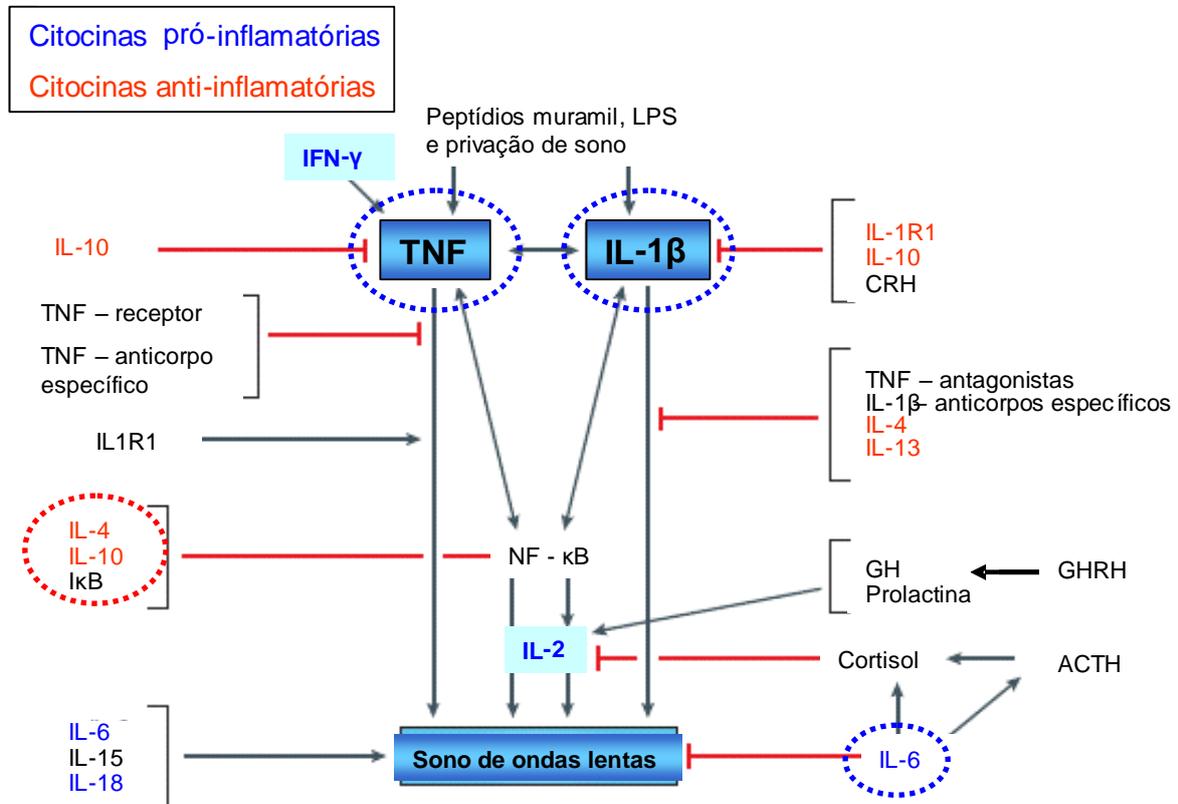
#### 1.4 Interação sono e sistema imunológico

Uma vez que cada sistema orgânico possui um papel distinto e crítico na adaptação às mudanças ambientais contínuas e desafiadoras, torna-se fundamental a condução de estudos visando investigar as maneiras pelas quais esses sistemas são afetados pelo sono e pela perda de sono. Dentre os muitos sistemas orgânicos que possuem uma forte relação com o sono, o sistema imunológico ganha destaque. Diversas evidências sugerem que essa relação é bidirecional, ou seja, o sono atua regulando o sistema imunológico e vice-versa.

As maiores evidências que comprovam essa interação são as proteínas mediadoras que são compartilhadas pelos dois sistemas: as citocinas inflamatórias. Na resposta imunológica, essas citocinas são secretadas por diversos subtipos celulares (principalmente fagócitos e linfócitos) e atuam como comunicação entre essas células, sendo capazes de influenciar tanto a resposta imune inata quanto adquirida. Existem dois principais tipos de citocinas: as pró-inflamatórias, que estimulam a resposta imunológica especificamente, através de proliferação das células e/ou produção de anticorpos; e as anti-inflamatórias, que por sua vez controlam ou inibem essa resposta, contra-balanceando o sistema e evitando respostas exacerbadas.

Durante processos infecciosos e inflamatórios, essas proteínas secretadas manifestam-se de forma distinta na regulação do padrão de sono: as citocinas pró-inflamatórias, principalmente interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), atuam aumentando o período de sono total, através do aumento do sono de ondas lentas (SOL); enquanto que as

citocinas anti-inflamatórias, principalmente a IL-4 e IL-10, agem reduzindo o tempo de SOL.



**Figura 2:** Principais vias de participação do sistema imunológico no sono. Destacados em azul estão as citocinas pró-inflamatórias, que tem a capacidade de estimular o sono de ondas lentas (SOL). Em vermelho, encontram-se destacadas as citocinas anti-inflamatórias, que atuam inibindo o SOL. ACTH: hormônio adenocorticotrófico; CRH: hormônio liberador de corticotropina; GH: hormônio do crescimento; GHRH: hormônio liberador do hormônio de crescimento; IκB: inibidor de NF-κB; NF-κB: fator nuclear κB; IL: interleucina; IL-1R1: receptor de IL-1; LPS: lipopolissacarídeo; TNF: fator de necrose tumoral. Fonte: Bryant *et al.*(2004).

### 1.5 Privação de sono e alterações na função imunológica

Muito embora a relação entre as citocinas inflamatórias e a fisiologia do sono se encontre cada vez mais estabelecida na literatura, ganha destaque também a relação entre condições de PS e o comprometimento da resposta imunológica. Diversos estudos demonstram sérios prejuízos imunológicos em modelos experimentais de PS, tanto em humanos quanto em animais.

Vale destacar que as alterações imunológicas provocadas pela PS estendem-se a níveis celulares, uma vez que diversos estudos comprovam que a quantidade de células imunológicas é drasticamente influenciada por diferentes períodos de PS (Dinges et al., 1994; Irwin et al., 1994; 1996; Ozturk et al., 1999; Velazquez-Moctezuma et al., 2004; Everson et al., 2008). Paralelamente, um estudo demonstrou que a PS em humanos é capaz de afetar também a resposta humoral a uma vacina. Nesse estudo, voluntários privados de sono por uma noite apresentaram um título de anticorpos para hepatite A 50% menor do que nos voluntários que dormiram normalmente, sugerindo assim que o sono deve ser considerado um fator essencial para a eficácia de uma vacinação (Lange et al., 2003).

Em animais, apesar da PS total aumentar o número de neutrófilos e monócitos circulantes e aumentar a produção de anticorpos, um forte indício de melhora na função imunológica, foi relatado um aumento na quantidade sérica de endotoxina bacteriana, sugerindo que, além da quantidade, a função das células imunológicas também é sensivelmente afetada (Everson, 2005). Anteriormente, foi demonstrado que esse mesmo protocolo de PS total prolongada é capaz de induzir bacteremia (Everson, 1993) e invasão de tecidos

por bactérias endógenas nos primeiros dias de PS (Everson e Toth, 2000), um forte indício de falha na erradicação de microorganismos.

Ainda, podemos ressaltar que resultados prévios do nosso laboratório demonstram prejuízos significativos na concentração celular também em protocolos de PSP, como exemplo, uma redução significativa dos linfócitos circulantes (Ruiz et al., 2007; Zager et al., 2007). Além disso, o protocolo de restrição crônica de sono, em que o animal é permitido dormir poucas horas por dia, durante 21 dias, também foi capaz de comprometer a quantidade de linfócitos no sangue (Zager et al., 2007). Esses trabalhos comprovam a hipótese de que, não só o sono como um todo, mas também as suas fases distintas, são importantes para a homeostasia imunológica. No entanto, a redução dos linfócitos circulantes dos animais PSP nos deixa o seguinte questionamento: essa redução seria provocada meramente por migração dessas células do sangue para sítios imunológicos específicos ou por morte celular?

Embora os mecanismos das alterações do sistema imunológico provocadas pela PS ainda não estejam bem esclarecidos, os estudos referentes a esse assunto apóiam a hipótese de que existem comprometimentos significativos da resposta imunológica inata e adquirida.

## 1.6 Exposição ao lipopolissacarídeo e alterações fisiológicas em resposta à infecção

Em condições de imunossupressão e/ou exposição a bactérias gram-negativas, como as que ocorrem durante a PS, o lipopolissacarídeo (LPS), é liberado. O LPS é o menor componente da membrana celular, e como tem uma potente capacidade imunogênica, é extensivamente utilizado como modelo de sepse aguda. Essa endotoxina, que age como um ativador inespecífico da resposta imunológica, também é capaz de influenciar a função neuroendócrina e a liberação de neurotransmissores (Zuckerman et al., 1989; Dunn, 2006).

Em modelos experimentais, a administração do LPS de *E. coli*, um forte estímulo para produção de citocinas inflamatórias, é capaz de aumentar sensivelmente o tempo de SOL/NREM em animais e humanos (Lancel et al., 1995; Mullington et al., 2000; Schiffelholz e Lancel, 2001). Além de alterações no padrão de sono, diversas alterações comportamentais são provocadas pela administração experimental de LPS, conhecidas como comportamento doentio (do inglês *sickness behavior*), dentre elas: diminuição da atividade locomotora (Kozak et al., 1994; Swiergiel e Dunn, 2007), interação social (Cohn e De Sa-Rocha, 2006) e consumo alimentar (Swiergiel et al., 1997; Dunn et al., 2006); sintomas dessa condição também incluem aumento da ansiedade (Lacosta et al., 1999; Swiergiel e Dunn, 2007) e depressão (Yirmiya, 1996; Dunn e Swiergiel, 2005), juntamente com alterações no controle da temperatura corpórea (Kozak et al., 1994; Blaque et al., 1996).

Essas alterações comportamentais provocadas pelo LPS ocorrem principalmente através da ativação da via do fator nuclear- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), a principal via de síntese e liberação de citocinas inflamatórias das células

imunológicas. Essas citocinas agem no SNC alterando diversos sistemas de neurotransmissão, aumentando principalmente a concentração de dopamina, noradrenalina e serotonina em diversas regiões cerebrais (Dunn, 1992b; 1992a; Dunn et al., 1999; Dunn, 2006). Ainda, diversos estudos mostram que essas alterações na neurotransmissão são mediadas também pela expressão da proteína ciclooxigenase-2 (COX-2) (Terao, Matsumura, Yoneda et al., 1998; Jain et al., 2001; Johnson et al., 2002; Swiergiel e Dunn, 2002; Dunn et al., 2006), uma enzima passo-limitante que cataliza a síntese de prostanóides, inclusive as prostaglandinas, em condições inflamatórias.

Considerando a PSP como um fator prejudicial ao bom funcionamento do organismo e de alta prevalência na sociedade moderna, torna-se relevante o estudo da PSP em modelos de desafio imunológico agudo, como o LPS. Assim, podemos sugerir que o sono não só exerce papel fundamental na resposta imunológica *per se*, mas na resposta fisiológica a um estímulo imunológico.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Apesar de diversos estudos afirmarem que condições de privação, ou mesmo restrição de sono, alteram a resposta imunológica, é escassa a literatura que diz respeito a modelos de PS e seus efeitos na resposta a um estímulo imunológico específico. Assim, estudos dessa magnitude tornam-se de suma importância, uma vez que essa ativação imunológica específica não só leva a alterações na função e migração das células na tentativa de combater a infecção, mas também a respostas no comportamento e na neurotransmissão central. Desta forma, podemos compreender melhor a interação do sono com o sistema imunológico através de mecanismos imunológicos e neuroquímicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- O objetivo geral do presente estudo foi investigar o papel do sono através da PSP na resposta de camundongos a um estímulo imunológico específico, o LPS.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar a perda de sono provocada pelo método da plataforma múltipla em camundongos;
- Analisar os efeitos da PSP na distribuição de células imunológicas no sangue e em sítios imunológicos específicos, como o peritônio, baço e linfonodos.
- Verificar os efeitos da PSP na resposta comportamental a um desafio imunológico (LPS), juntamente com alterações na neurotransmissão e expressão de proteínas inflamatórias no SNC de camundongos;
- Investigar a associação da PSP e da administração de LPS na expressão do rebote de sono de camundongos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados no presente estudo camundongos *inbred* da linhagem C57BL/6J\* machos de três meses de idade. Todos os animais foram obtidos do biotério do Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR) da Universidade Federal de São Paulo. O estudo foi conduzido em condições de luz (claro das 7 às 19 horas) e temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) controladas automaticamente. Ração e água foram mantidos à vontade nas gaiolas padrão de polipropileno. Os experimentos foram conduzidos segundo princípios éticos e sob aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (Processo CEP nº1297/06).

O máximo de esforço foi despendido para minimizar possíveis desconfortos causados aos animais. Além disso, em todos os experimentos do presente trabalho buscou-se empregar a filosofia dos “3Rs”, que tem como objetivo reduzir o tamanho da amostra sem comprometer as análises estatísticas e interpretação dos resultados.

### 4.2 Drogas

Lipopolissacarídeo (LPS derivado de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma, St. Louis, EUA) foi dissolvido em salina estéril 0,9% nas doses de 1, 5, 10 ou 20  $\mu\text{g}/\text{animal}$ . Salina estéril foi usada como veículo. Todos os grupos foram injetados intraperitonealmente (ip) com um volume de 0,2 mL.

---

\* Essa linhagem foi escolhida, pois exibe uma grande semelhança genética, ou seja, a variância dos resultados experimentais é muito pequena.

### 4.3 Privação de sono paradoxal (PSP)

Os animais foram submetidos à PSP pelo método da plataforma múltipla por 72 horas que consiste em colocar 5 animais em uma caixa de polipropileno (38 x 31 x 17 cm) contendo 12 plataformas circulares de 3,5 cm de diâmetro submersas em água, sendo o nível da água 1 cm abaixo da superfície das plataformas. Esse método baseia-se no princípio da atonia muscular presente durante os eventos de sono paradoxal, que faz com que os animais acordem ao encostar o focinho ou outra parte do corpo na água.



**Figura 3:** Ilustrações da metodologia das plataformas múltiplas em camundongos.

### 4.4 Preparação de suspensões celulares do lavado peritoneal, baço e linfonodo

Após a eutanásia dos animais pelo método de decapitação e remoção da pele da região abdominal, 5 mL de meio RPMI 1640 foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. Após massageamento da região abdominal, o fluido contendo as células foi aspirado com o auxílio de seringa e agulha. Em seguida, o baço e os linfonodos inguinais foram retirados e macerados separadamente em meio RPMI 1640. Foram realizados *pools* das amostras para cada grupo e órgão e essas suspensões foram centrifugadas a 1500 RPM

por 5 minutos. Para os linfonodos, o sobrenadante foi desprezado e o pellet das células ressuspensas em 5 mL de meio RPMI 1640. Para realização da lise das hemácias, o lavado peritoneal e baço foram centrifugados mais uma vez com tampão de lise a 1000 RPM por 5 minutos. Após a lise, as células do lavado peritoneal foram ressuspensas em 5 mL e as células do baço ressuspensas em 10 mL de meio RPMI 1640.

#### **4.5 Marcação das células e avaliação dos subtipos celulares por citometria de fluxo**

As células isoladas a partir dos órgãos foram ajustadas para  $1 \times 10^6$  com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio, e foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão fosfato salina (PBS). Para marcação das células, foi adicionado 1  $\mu$ L de cada anticorpo específico (BD Pharmigen, EUA) respeitando a seguinte conjugação:

- Linfócitos T auxiliares: CD3<sup>+</sup> (FITC) e CD4<sup>+</sup> (PerCP)
- Linfócitos T citotóxicos: CD3<sup>+</sup> (FITC) e CD8<sup>+</sup> (PE)
- Linfócitos B: CD45<sup>+</sup> (PE) e CD19<sup>+</sup> (PerCP)
- Células *natural killer*: CD45<sup>+</sup> (PE) e NK1.1<sup>+</sup> (FITC)
- Macrófagos: CD45<sup>+</sup> (PE) e F4/80<sup>+</sup> (FITC)
- Células dendríticas: CD45<sup>+</sup> (PE) e CD11c<sup>+</sup> (FITC)

Após a marcação por 1 hora à 4°C, as amostras foram lavadas para retirada do excesso de anticorpo e fixadas com paraformaldeído 1%.

#### **4.6 Obtenção e análise dos dados por citometria de fluxo**

No dia da leitura, as amostras foram lavadas mais uma vez e ressuspensas em 1 mL de PBS e lidas no citômetro de fluxo (BD FACScalibur, EUA) do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP. A porcentagem de células positivas, bem como a determinação do valor percentual de populações e sub-populações celulares foi realizada através do software *Cell Quest* (BD Biosciences, EUA).

#### **4.7 Contagem diferencial de leucócitos na corrente sanguínea**

Após a eutanásia, o sangue dos animais destinados à coleta de órgãos imunológicos foi coletado em tubos contendo solução anticoagulante (EDTA), e a contagem diferencial de leucócitos foi realizada em contador automatizado (Advia 120 Hematology System, EUA) no mesmo dia da coleta.

#### **4.8 Campo aberto**

O campo aberto é um aparelho que consiste em uma arena de madeira, de aspecto circular com 40 cm de diâmetro e 50 cm de altura, com seu chão dividido por linhas pretas em um círculo central e trapézios ao redor deste, somando um total de 19 unidades (12 quadrantes periféricos e 7 centrais).

O teste se iniciava quando os animais eram colocados sobre o círculo central e tinham seus comportamentos motores avaliados por um período de 5 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo de latência (tempo que o animal leva para iniciar o movimento), frequência de locomoção central (penetrar em uma divisão central da arena com as quatro patas), frequência de locomoção periférica (penetrar em uma divisão periférica da arena com as

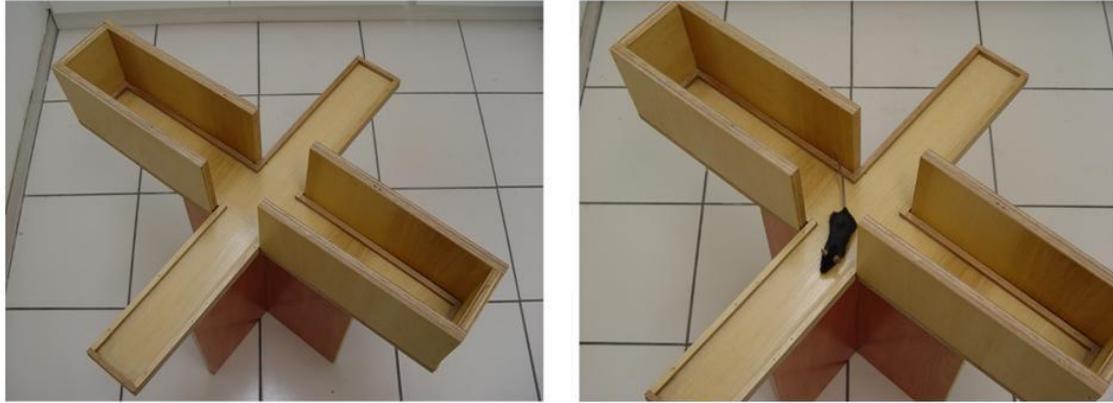
quatro patas), frequência de locomoção total (soma da locomoção central e periférica), frequência de levantar (apoio somente nas patas traseiras) e tempo de imobilidade (tempo que o animal não apresenta nenhuma atividade motora). Cada animal foi avaliado individualmente sendo que o aparelho foi limpo entre um animal e outro com solução de etanol 20%, evitando qualquer interferência do odor do animal anterior.



**Figura 4:** Fotos do campo aberto. A imagem à esquerda é uma visão geral, exibindo as divisões na arena circular. A imagem à direita mostra detalhes da estrutura juntamente com o animal.

#### 4.9 Labirinto em cruz-elevado

O aparelho consiste em um labirinto com dois braços abertos (28.5 x 7 cm) e dois braços fechados (28.5 x 7 x 14 cm), dispostos perpendicularmente e elevados a 50 cm do solo. Imediatamente após o teste de campo aberto, cada animal foi transferido individualmente para o aparelho de labirinto em cruz-elevado. O número de entradas, assim como o tempo de permanência em cada braço foram analisados durante 5 minutos. Para obtermos a porcentagem de tempo em cada braço, a seguinte fórmula foi aplicada:  $(\text{tempo nos braços abertos} / (\text{tempo nos braços abertos} + \text{tempo nos braços fechados})) \times 100$ .



**Figura 5:** Fotos do aparelho de labirinto em cruz-elevado. Na foto à esquerda, a representação dos dois braços abertos e dos dois braços fechados do labirinto; à direita, ilustra-se o animal explorando o aparelho.

#### 4.10 Coleta de sangue e tecidos

Após os testes comportamentais, os animais foram levados a uma sala adjacente e eutanasiados pelo método de decapitação. O sangue dos animais foi coletado em tubos contendo solução anticoagulante (EDTA) e centrifugado a 4°C a uma velocidade de 1.500g por 15 minutos, o plasma retirado foi armazenado a -80°C até as análises hormonais. O encéfalo foi imediatamente dissecado para a coleta do córtex, hipotálamo e estriado, que em seguida foram armazenados a -80°C até os ensaios.

#### 4.11 Corticosterona

Os níveis plasmáticos de corticosterona foram determinados pelo método de radioimunoensaio utilizando kit comercial (MP Biomedicals, EUA) específico para ratos e camundongos. A sensibilidade do ensaio foi de 0,25 ng/mL.

#### 4.12 Determinação da expressão protéica de COX-2

Os tecidos isolados foram homogeneizados em tampão de lise gelado (pH 7,4) contendo 50 mM Tris (pH 8,0), 250 mM de NaCl, 1% de nonidet P-40 (NP-40), 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,25% de deoxicolato de sódio, 1 mM ditodtreiol (DTT), 20  $\mu$ M polimetilsulfonilclorida (PMSF), além do tablete completo de inibidores de proteases (Roche, ALE). O lisado foi então centrifugado a 12.000g a 4°C por 40 minutos.

A concentração de proteínas do extrato foi determinada pelo método de Lowry. Uma solução de soro albumina bovina (1 mg/mL) foi utilizada como padrão. As leituras das absorbâncias foram feitas em um espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 620 nm.

Massas iguais de proteínas totais (40  $\mu$ g por linha) foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS 10%, utilizando-se o sistema Mini VE (GE, EUA). Adicionou-se o tampão de corrida e em seguida iniciou-se a corrida em condições constantes de voltagem (60 V) e variável de amperagem (15 a 45 mA). Após a separação protéica, deu-se início à transferência (por uma hora, 100 V, 250 mA) para a membrana de nitrocelulose onde utilizou-se o sistema *Mini transblot electrophoretic transfer cell* (GE, EUA) imerso em gelo. Após a transferência, as membranas foram coradas em solução de *ponceau S*, para verificação da qualidade do processo. Em seguida, as membranas foram lavadas (descoradas) em tampão Tris/molico 10% por uma hora sob agitação constante. Após isso, foi realizada a incubação com o anticorpo primário adequado, diluído em TBST/molico 10% (anti COX-2 1:400; Calbiochem ou anti  $\beta$ -tubulina 1:500; Chemicon). Em seguida, foram feitas várias lavagens em TBST para a retirada do excesso de anticorpo primário, para que assim se

puдesse proceder com a incubação do anticorpo secundário adequado (1:5000, GE, EUA, conjugado a uma enzima *horseadish* peroxidase).

A visualização das bandas foi realizada através do emprego do substrato quimioluminescente ECL (Amersham, EUA) e posterior exposição ao filme fotográfico. A quantificação densitométrica das bandas obtidas se deu por intermédio de uma análise computadorizada utilizando o software ImageJ.

#### **4.13 Avaliação das monoaminas centrais**

Os tecidos foram, individualmente pesados e homogenizados por sonda ultrasônica em 500  $\mu$ L de solução ácido perclórico (0,1M de ácido perclórico, 0,4mM de metabissulfito de sódio como agente antioxidante e 0,2mM de EDTA). Os homogenatos foram centrifugados a 20.000 x *g* por 15 minutos a 4°C, filtrados em membranas de acetato de celulose (tubos para microcentrífuga com filtro acoplado de 0,22  $\mu$ m, *Corning Spin-x*<sup>®</sup> *centrifuge tube filters*) e estocados a -80°C para análises posteriores. O precipitado foi diluído em uma solução de hidróxido de sódio a 0,1N e avaliado para proteínas utilizando a quantificação colorimétrica em microplaca, pelo ácido bicinconínico (Pierce Chemical, Rockford, IL, EUA).

Os sobrenadantes foram injetados (20  $\mu$ L) em um circuito fechado de alta pressão de um aparelho de cromatografia líquida (Auto-injetor SIL-10A; Bomba LC-10AD; Shimadzu, Japão) e submetidos à separação isocrática rápida de fase reversa por um sistema de colunas baseadas em sílica C18 (coluna Spheri-5, C18, ODS, 5  $\mu$ m, 25 cm x 4,6 mm, conectada a uma pré-coluna NewGuard Cartridge Column, RP-18, 7  $\mu$ m; PerkinElmer Brownlee Columns, EUA). A fase móvel foi constituída de um tampão de 0,163M de ácido

cítrico e de 0,06M de fosfato de sódio dibásico anidro, com 0,69mM de octil-sulfato de sódio como agente pareador de íons, adicionados com 12mM de EDTA e ácido ortofosfórico, o suficiente para estabilizar o pH em 2,85. A polaridade da fase foi previamente ajustada adicionando-se 4% de acetonitrila e 1,7% de tetrahidrofurano em veículo aquoso (água bidestilada). A fase móvel foi então filtrada em uma membrana de acetato de celulose de 0,2 µm, desgaseificada por meio do borbulhamento de gás hélio e circulada no sistema a um fluxo de 1,4 mL/min. As monoaminas foram detectadas eletroquimicamente utilizando um detector amperométrico (L-ECD-6A, Shimadzu, Japão), por oxidação em um eletrodo de vidro/carbono a um potencial de 850 mV positivos em relação a outro eletrodo de referência Ag-AgCl. Cada amostra foi analisada em duplicata para as concentrações de L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA), norepinefrina (NE), dopamina (DA) e seus metabólitos não conjugados ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). A taxa de recuperação dos analitos foi determinada pela adição de uma quantidade pré-determinada do padrão interno DHBA (diidroxibenzilamina) no momento da homogenização dos tecidos. As áreas dos picos da amostras foram comparadas com as áreas dos picos dos padrões de cada neurotransmissor ou metabólito, que foram injetados em concentrações conhecidas, de forma intervalada entre as corridas.

#### 4.14 Cirurgia estereotáxica e registro de sono

Após a indução anestésica (associação de cloridrato de cetamina e xilazina na dose de 10mg/Kg i.p.), os animais foram tricotomizados na região superior da cabeça e fixados ao aparelho estereotáxico. Com a exposição do periósteo, foram demarcadas as coordenadas estereotáxicas. Com o auxílio de uma broca odontológica, foram realizados quatro orifícios onde foram atarraxados quatro microparafusos (diâmetro de 1,9 mm) de aço inoxidável, além de dois eletrodos feitos de fio níquel-cromo revestidos com teflon no músculo dorsal do pescoço (trapézio), possibilitando assim o registro eletromiográfico (EMG). Todos os eletrodos corticais são ligados por meio de fios de níquel-cromo revestidos com teflon a um conector, e este foi fixado ao crânio do animal com acrílico autopolimerizante odontológico. Ao final da cirurgia, diclofenaco sódico e pentabiótico foram administrados para prevenir processos inflamatórios, infecções e promover analgesia. A recuperação pós-cirúrgica foi fixada em 14 dias.

Após a recuperação, os animais foram submetidos a uma adaptação ao cabo de registro de, no mínimo, 24 horas, seguida pelo registro de sono (EMBLA Medical digital polygraph, Reykjavik, Islândia). A análise do padrão de sono foi realizada por um único experimentador em segmentos de 10 segundos e os seguintes parâmetros foram analisados: tempo total de sono (porcentagem do tempo de sono em relação ao tempo de registro), tempo de SOL (porcentagem do tempo de SOL em relação ao tempo de registro) e tempo de sono paradoxal (porcentagem do tempo de sono paradoxal em relação ao tempo de registro).

#### **4.15 Análise estatística**

A porcentagem de células nos órgãos imunológicos e o número total de células no sangue foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de Newman-Keuls, quando apropriado.

Para os testes comportamentais, concentração de monoaminas e de corticosterona, ANOVA de duas vias foi aplicada, seguida do teste pos-hoc de Tukey. Para os parâmetros de sono, teste t para amostras dependentes foi utilizado para o registro durante a PSP e ANOVA de medidas repetidas seguida do teste de Tukey foi aplicada para o registro da recuperação de sono.

A expressão de COX-2 foi analisada por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Para a correlação entre a expressão de COX-2 no córtex e o tempo de SOL foi aplicado o teste de correlação de Pearson.

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão e o nível de significância estabelecido foi de  $p \leq 0,05$ .

## **5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS**

### **5.1 Experimento 1: Efeito da privação de sono por 72 horas no padrão de sono de camundongos**

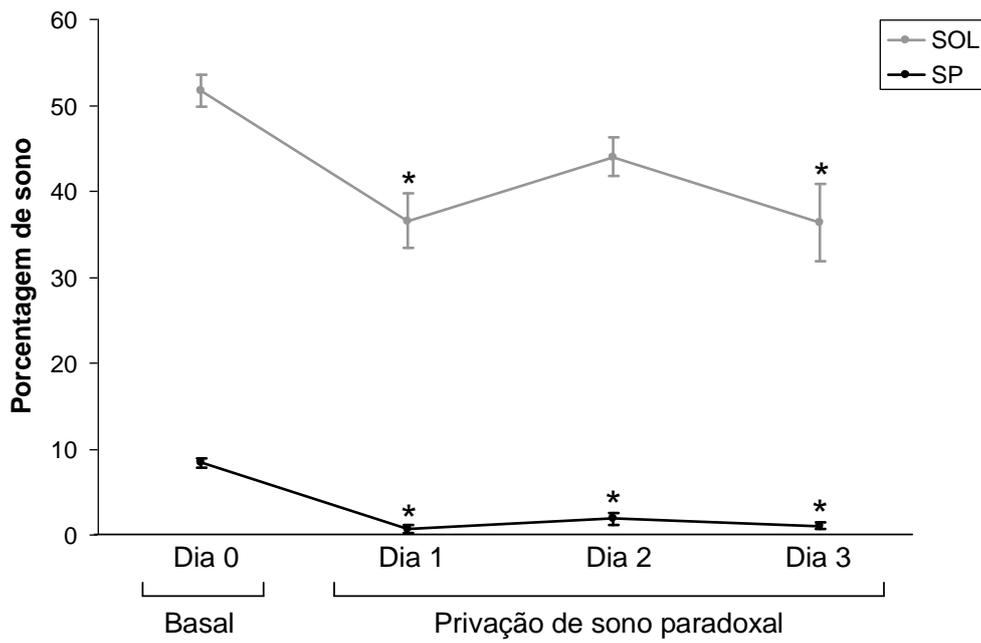
No intuito de quantificar a perda de sono provocada pelo método da plataforma múltipla em camundongos, animais aleatoriamente selecionados (n=8) foram submetidos à PSP e ao registro de sono simultaneamente (EMBLA Medical digital polygraph, Reykjavik, Islândia).

#### **5.1.1 Sono de ondas lentas**

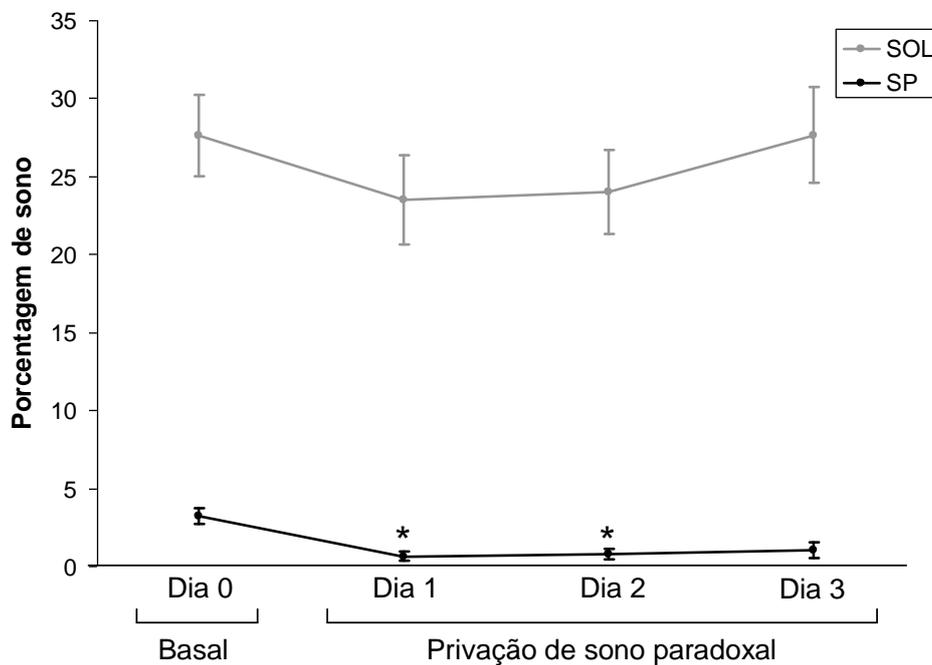
O método das plataformas múltiplas empregado no presente projeto foi suficiente para causar prejuízos significativos no padrão de sono dos animais. A porcentagem de SOL em relação ao registro sofreu redução significativa em relação ao registro basal no período claro do dia 1 ( $p<0,01$ ) e 3 ( $p<0,05$ ) (Fig. 6). No período escuro, nenhuma alteração significativa foi encontrada na quantidade de SOL (Fig. 7).

#### **5.1.2 Sono paradoxal**

A porcentagem de SP sofreu uma forte redução no período claro durante todo o protocolo de PSP: dia 1 ( $p<0,001$ ), dia 2 ( $p<0,01$ ), e dia 3 ( $p<0,001$ ) comparado com o período basal (Fig. 6). Entretanto, no período escuro, essa redução apresentou-se somente nos dias 1 ( $p<0,01$ ) e 2 ( $p<0,01$ ) (Fig. 7).



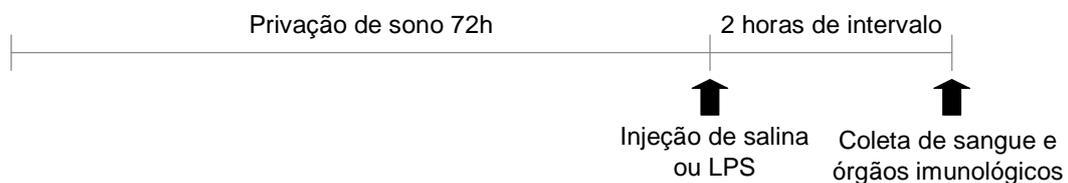
**Figura 6:** Padrão de sono na fase clara durante o período basal e durante a privação de sono paradoxal. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* diferente do período basal.



**Figura 7:** Padrão de sono na fase escura durante o período basal e durante a privação de sono paradoxal. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* diferente do período basal.

## 5.2 Experimento 2: Efeito da privação de sono paradoxal na resposta imunológica de camundongos tratados com LPS

Esse experimento foi realizado no intuito de avaliar o papel da falta de sono na resposta imunológica provocada por um desafio imunológico, o LPS. Desta forma, os animais foram privados de sono por 72 horas, sendo que os grupos controle permaneceram em suas gaiolas moradia. Após o término da privação de sono, todos os grupos (n=5/pool por grupo) receberam uma injeção de LPS (doses de 1 ou 5  $\mu\text{g}$ ) ou salina. Em seguida da injeção, os animais retornaram às suas respectivas gaiolas por um intervalo de duas horas antes da eutanásia e da coleta do lavado peritoneal, baço, linfonodo e sangue. Todos os experimentos foram conduzidos entre 0900h e 1200h.



**Figura 8:** Representação esquemática do desenho experimental adotado no protocolo de análise imunológica.

### 5.2.1 Lavado peritoneal

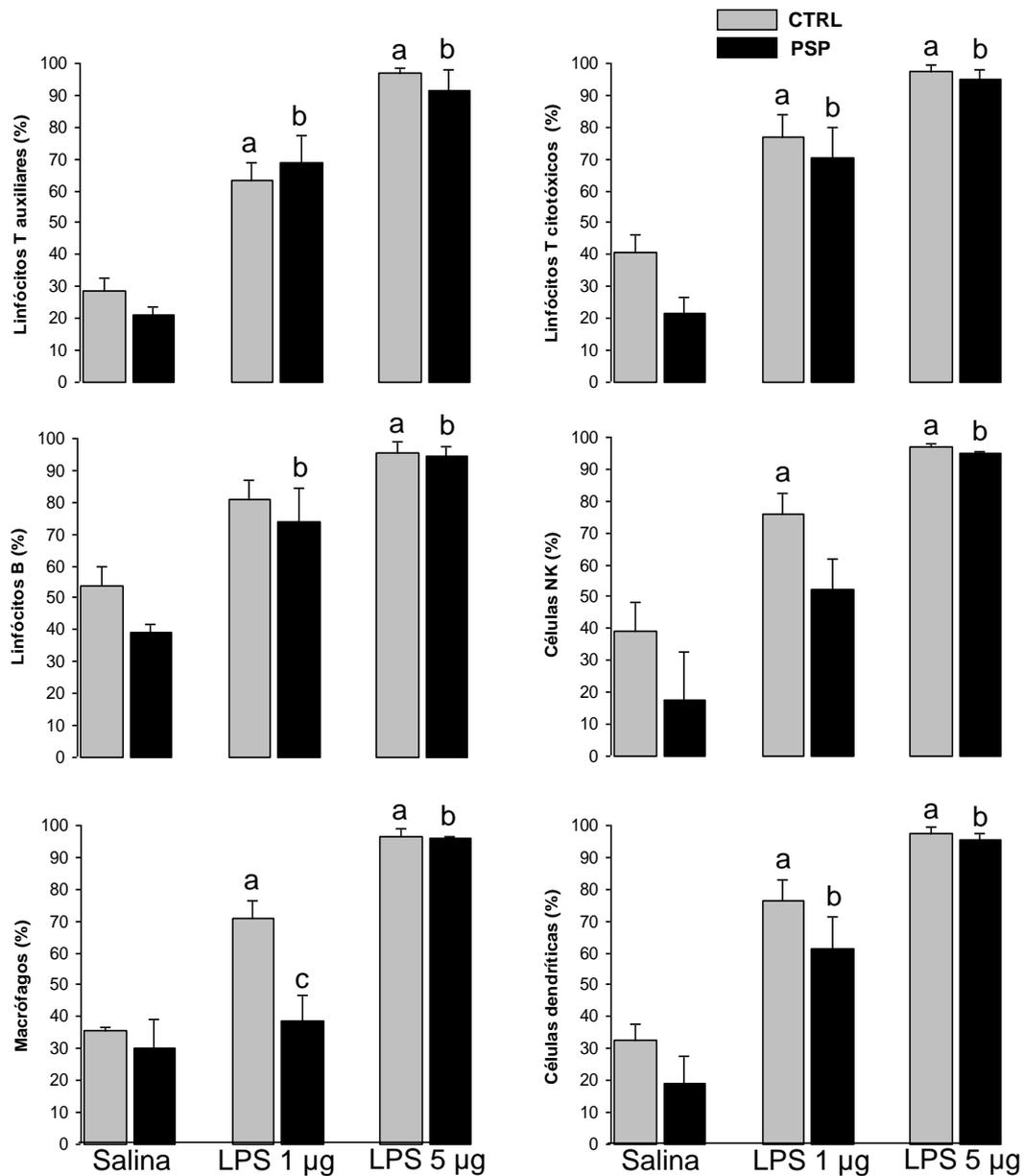
A ANOVA de duas vias revelou um efeito tratamento [ $F(2,8)=50,31$ ;  $p<0,0001$ ] na porcentagem de linfócitos T auxiliares no peritônio dos animais tratados com LPS. O teste pos hoc Newman-Keuls demonstrou que os grupos CTRL-LPS 1  $\mu\text{g}$  ( $p<0,005$ ) e CTRL-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p<0,001$ ) apresentaram aumento dessas células em comparação ao grupo CTRL-Sal. Paralelamente, os animais PSP também apresentaram aumento similar nos grupos PSP-LPS 1  $\mu\text{g}$

( $p < 0,004$ ) e PSP-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo PSP-Sal. Quanto à porcentagem de linfócitos T citotóxicos, a ANOVA revelou apenas um efeito tratamento [ $F(2,8)=37,67$ ;  $p < 0,0001$ ]. O tratamento com LPS mostrou-se capaz de aumentar a porcentagem dessas células nos animais CTRL (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,01$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,003$ ) e PSP (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,003$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,0007$ ) em relação ao seu respectivo grupo salina (Fig. 9).

Paralelamente, a porcentagem de linfócitos B também apresentou um efeito tratamento demonstrado pela ANOVA [ $F(2,8)=18,92$ ;  $p < 0,0009$ ]. Nos animais CTRL, somente a dose de 5  $\mu\text{g}$  foi capaz de aumentar a porcentagem dessas células. Entretanto, nos animais PSP, esse aumento foi encontrado em todas as doses (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,02$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,01$ ). As células *natural killer* apresentaram um efeito tratamento revelado pela ANOVA [ $F(2,8)=26,00$ ;  $p < 0,001$ ]. O teste de Newman-Keuls revelou aumento dessas células nos animais CTRL (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,04$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,01$ ) e PSP (5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$ ) tratados com LPS (Fig. 9).

A porcentagem de macrófagos apresentou um efeito grupo [ $F(1,8)=6,03$ ;  $p < 0,03$ ] e tratamento [ $F(2,8)=45,94$ ;  $p < 0,0001$ ] revelado pela ANOVA. O tratamento com LPS aumentou a proporção de macrófagos no peritônio nas doses de 1  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,01$ ) e 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,001$ ) nos animais CTRL, e somente na dose de 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,001$ ) nos animais PSP. Entretanto, a PSP reverteu o aumento de macrófagos na dose de 1  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,01$ ) em relação ao seu respectivo grupo CTRL. A ANOVA de duas vias revelou um efeito tratamento [ $F(2,8)=39,04$ ;  $p < 0,0001$ ] na porcentagem de células dendríticas no peritônio dos animais tratados com LPS. O teste pos hoc Newman-Keuls revelou que os grupos CTRL-LPS 1  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,01$ ) e CTRL-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,01$ ) apresentaram

aumento dessas células em comparação ao grupo CTRL-Sal. Paralelamente, os animais PSP apresentaram aumento similar nas doses de 1  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,01$ ) e 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,001$ ), em relação ao grupo PSP-Sal (Fig. 9).



**Figura 9:** Porcentagem de células imunológicas no lavado peritoneal de animais PSP tratados com salina ou LPS. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal, <sup>c</sup> difere do grupo CTRL-LPS 1  $\mu\text{g}$ .

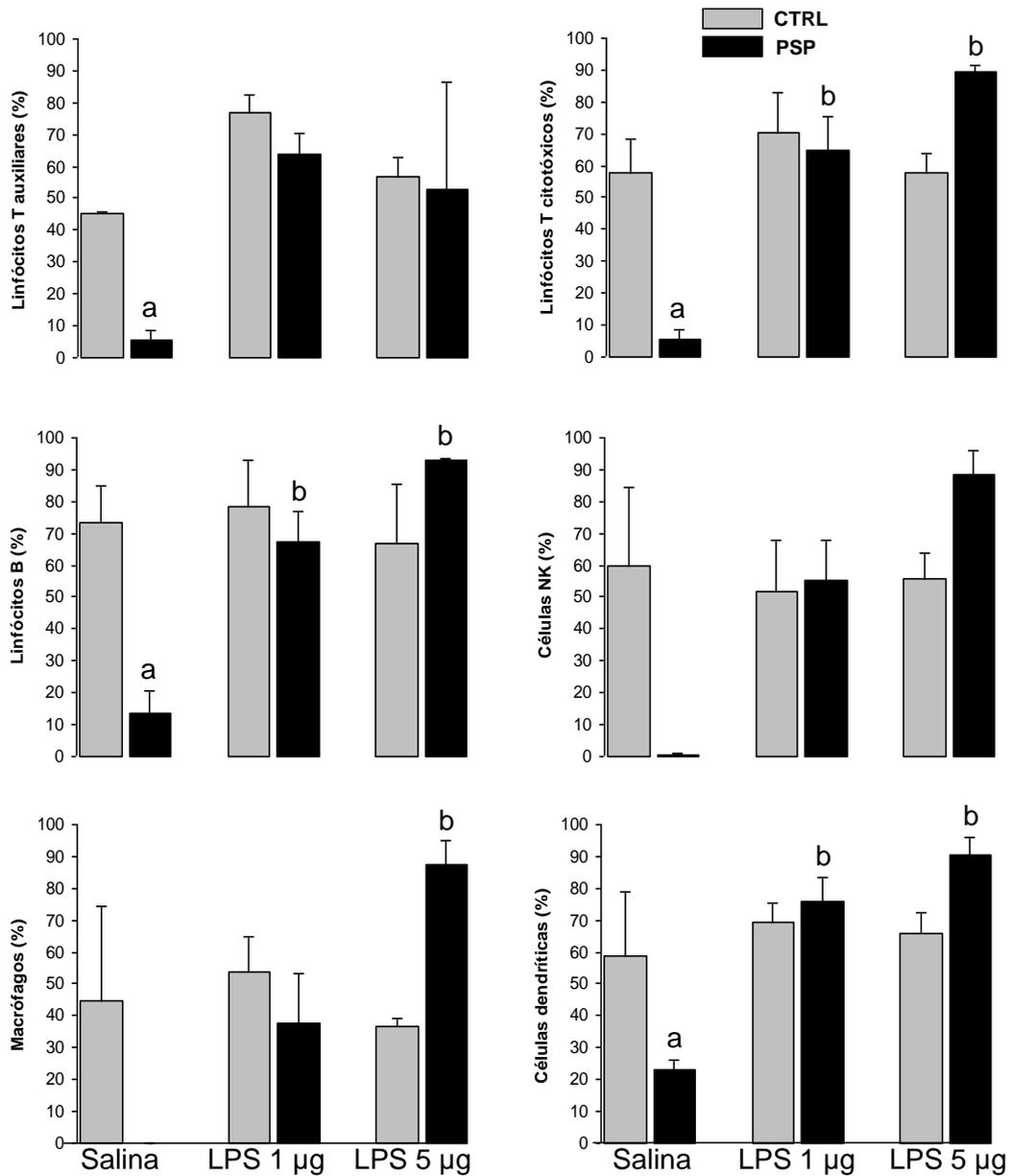
### 5.2.2 Baço

A ANOVA de duas vias revelou um efeito tratamento [ $F(2,8)=7,03$ ;  $p<0,01$ ] na porcentagem de linfócitos T auxiliares no baço dos animais tratados com LPS. O teste pos hoc Newman-Keuls revelou diminuição da porcentagem dessas células no grupo PSP-Sal ( $p<0,05$ ) em relação ao CTRL-Sal. A porcentagem de linfócitos T citotóxicos apresentou um efeito tratamento [ $F(2,8)=8,92$ ;  $p<0,009$ ] e interação grupo x tratamento [ $F(2,8)=7,23$ ;  $p<0,01$ ] revelado pela ANOVA. O teste pos hoc Newman-Keuls revelou diminuição da porcentagem dessas células no grupo PSP-Sal ( $p<0,001$ ) em relação ao CTRL-Sal. Além disso, o tratamento com LPS nos animais PSP provocou um aumento significativo da porcentagem de linfócitos T citotóxicos em todas as doses (1  $\mu\text{g}$ ,  $p<0,01$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p<0,01$ ) (Fig. 10).

A porcentagem de linfócitos B apresentou um efeito interação [ $F(2,8)=5,34$ ;  $p<0,05$ ] revelado pela ANOVA. O teste pos hoc Newman-Keuls revelou diminuição da porcentagem dessas células no grupo PSP-Sal ( $p<0,05$ ) em relação ao CTRL-Sal. Além disso, o tratamento com LPS nos animais PSP provocou um aumento significativo da porcentagem de linfócitos B em todas as doses (1  $\mu\text{g}$ ,  $p<0,05$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p<0,05$ ). Paralelamente, a porcentagem de macrófagos também apresentou um efeito interação demonstrado pela ANOVA [ $F(2,8)=4,73$ ;  $p<0,05$ ]. Somente o grupo PSP-LPS 5  $\mu\text{g}$  apresentou aumento dessas células em relação ao grupo PSP-Sal ( $p<0,05$ ) (Fig. 10).

A porcentagem de células dendríticas apresentou um efeito grupo [ $F(2,8)=8,69$ ;  $p<0,001$ ] e tratamento [ $F(2,8)=4,97$ ;  $p<0,05$ ] revelado pela ANOVA. O teste pos hoc Newman-Keuls revelou diminuição da porcentagem dessas células no grupo PSP-Sal ( $p<0,05$ ) em relação ao CTRL-Sal. O

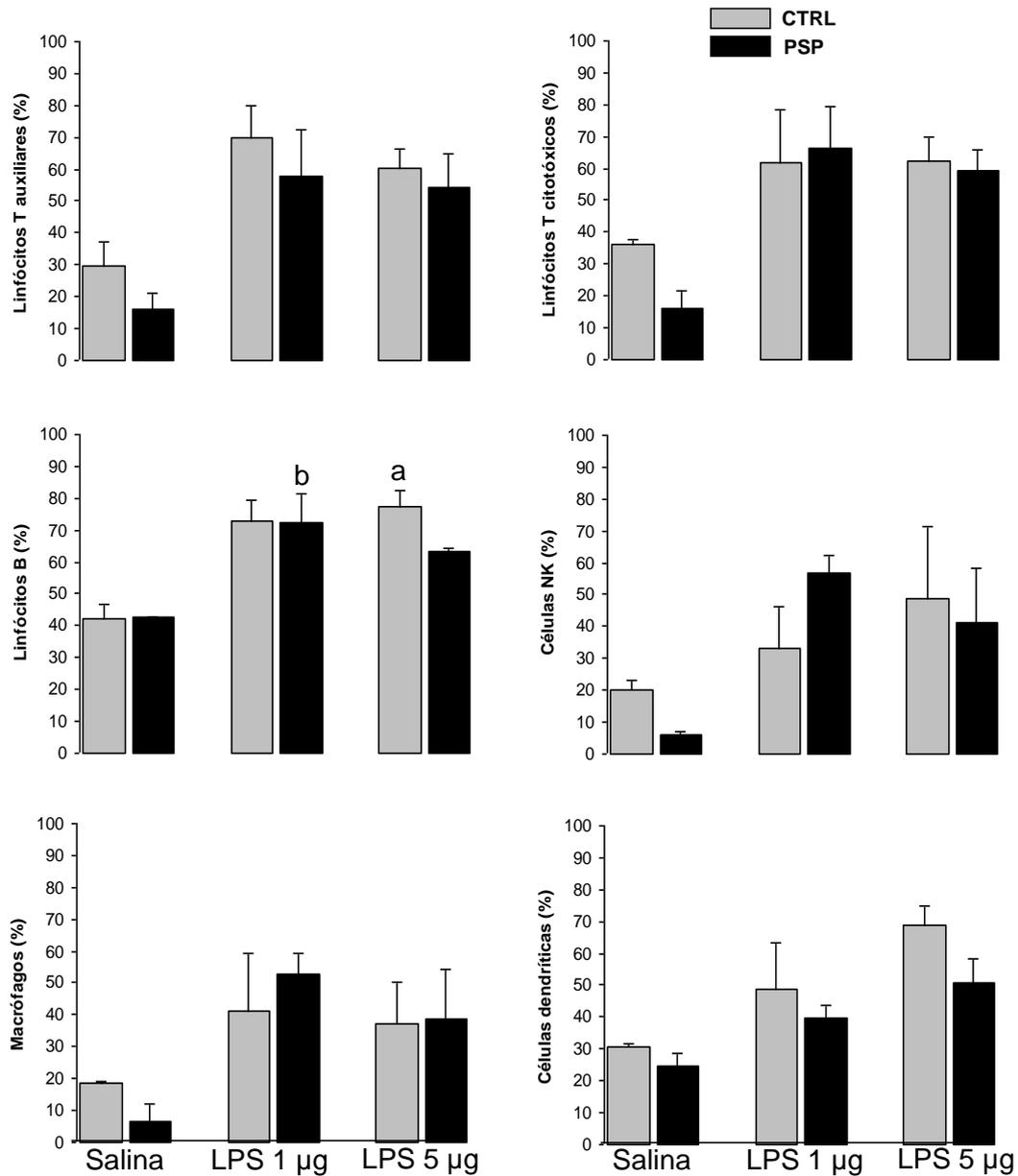
tratamento com LPS em todas as doses (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,05$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,01$ ) aumentou a proporção de células dendríticas nos animais PSP em relação ao grupo PSP-Sal (Fig. 10).



**Figura 10:** Porcentagem de células imunológicas no baço de animais PSP tratados com salina ou LPS. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

### 5.2.3 Linfonodos

A ANOVA de duas vias revelou um efeito tratamento [ $F(2,8)=12,02$ ;  $p<0,005$ ] somente na porcentagem de linfócitos B nos linfonodos inguinais. Nos animais CTRL, somente a dose de 5  $\mu\text{g}$  ( $p<0,05$ ) de LPS aumentou a porcentagem de linfócitos B, enquanto que nos animais PSP, esse aumentou só foi significativo na dose de 1  $\mu\text{g}$  ( $p<0,05$ ) (Fig. 11).



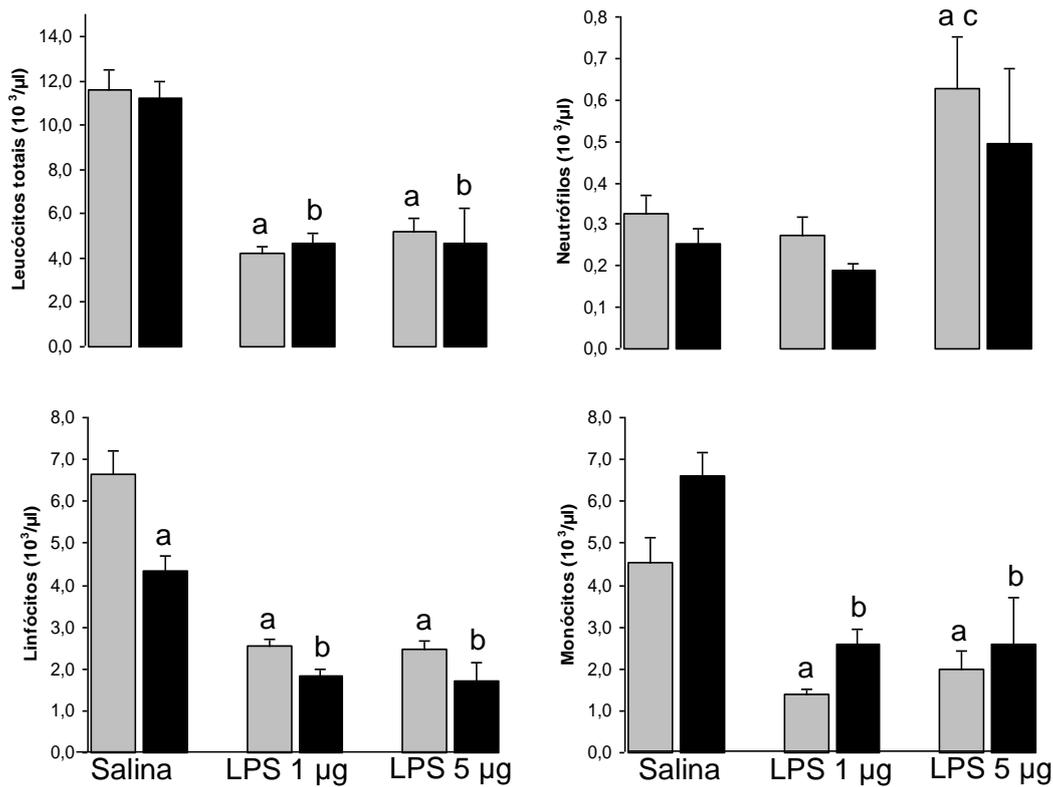
**Figura 11:** Porcentagem de células imunológicas nos linfonodos inguinais de animais PSP tratados com salina ou LPS. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

#### 5.2.4 Contagem diferencial de leucócitos no sangue

A quantidade total de leucócitos na circulação dos animais sofreu somente um efeito tratamento [ $F(2,55)=45,80$ ;  $p<0,001$ ] demonstrado pela ANOVA de duas vias. O teste de pos hoc de Newman-Keuls mostrou que o tratamento com LPS provocou diminuição da quantidade de leucócitos tanto

nos animais CTRL (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$ ), quanto nos animais PSP (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$ ) em relação aos seus respectivos grupos salina. Quanto a quantidade de neutrófilos circulantes, a ANOVA relatou também apenas um efeito tratamento [ $F(2,55)=8,97$ ;  $p < 0,001$ ]. Somente o grupo CTRL-LPS 5  $\mu\text{g}$  apresentou aumento nessas células em relação aos grupos CTRL-Sal ( $p < 0,05$ ) e CTRL-LPS 1  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,05$ ) (Fig. 12).

A ANOVA de duas vias pode demonstrar um significativo efeito grupo [ $F(1,55)=19,84$ ;  $p < 0,001$ ], tratamento [ $F(2,55)=57,27$ ;  $p < 0,001$ ] e interação [ $F(2,55)=4,16$ ;  $p < 0,001$ ] na quantidade de linfócitos na circulação desses animais. A PSP isoladamente já conseguiu provocar uma redução significativa nos linfócitos circulantes ( $p < 0,001$ ), assim como o tratamento com LPS nos animais CTRL (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$ ). Nos animais PSP, essa redução também foi presente em todas as doses (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$ ) em relação ao grupos PSP-Sal. Paralelamente, a quantidade de monócitos circulantes apresentou um efeito grupo [ $F(1,55)=4,79$ ;  $p < 0,05$ ] e tratamento [ $F(2,55)=23,71$ ;  $p < 0,001$ ] revelado pela ANOVA. O tratamento com LPS foi eficaz em reduzir a quantidade de monócitos em todas as doses, tanto nos animais CTRL (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,01$ ) como nos animais PSP (1  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$  e 5  $\mu\text{g}$ ,  $p < 0,001$ ) (Fig. 12).

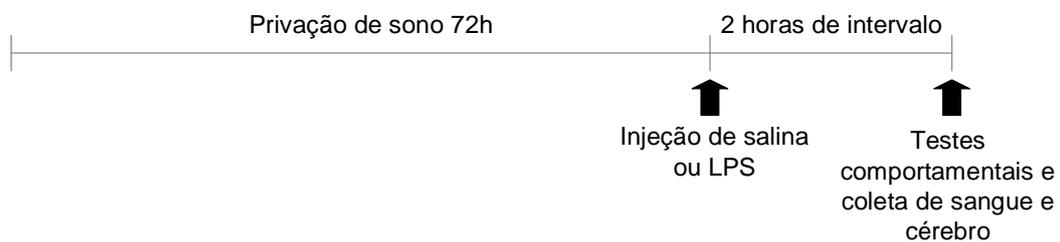


**Figura 12:** Quantidade total de células imunológicas na corrente sanguínea de animais PSP tratados com salina ou LPS. os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo ctrl-sal, <sup>b</sup> difere do grupo psp-sal, <sup>c</sup> difere do grupo CTRL-LPS 1  $\mu\text{g}$ .

### 5.3 Experimento 3: Efeito da privação de sono paradoxal na resposta comportamental e neuroquímica ao LPS

Esse experimento foi realizado no intuito de avaliar o papel do sono assim como da falta de sono na resposta comportamental provocada por um desafio imunológico, o LPS. Desta forma, os animais foram privados de sono por 72 horas, sendo que os grupos controle permaneceram em suas gaiolas moradia. Após o término da PSP, todos os grupos ( $n=10/\text{grupo}$ ) receberam uma injeção de LPS (doses de 5, 10 ou 20  $\mu\text{g}$ ) ou salina. Em seguida da injeção, os animais retornaram às suas respectivas gaiolas por um intervalo de

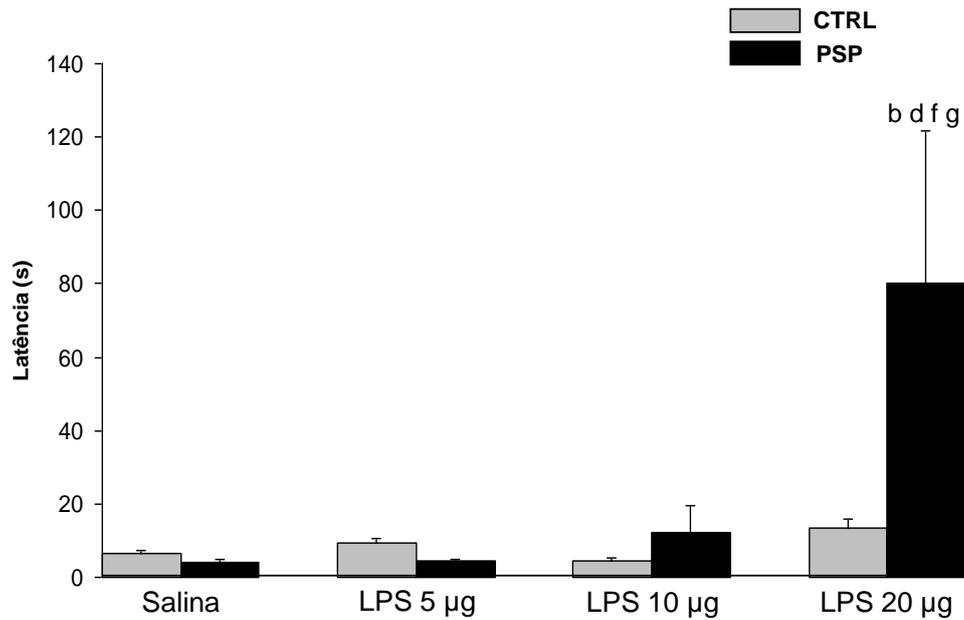
duas horas antes dos testes comportamentais e coleta de tecidos. Esse intervalo foi escolhido por ser o tempo necessário para que os níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrópico e corticosterona atinjam seu pico máximo (Takao et al., 1990; Yirmiya, 1996) e as alterações comportamentais induzidas pelo LPS sejam expressas com mais destaque (Kozak et al., 1994). Todos os experimentos foram conduzidos entre 0900h e 1200h.



**Figura 13:** Representação esquemática do desenho experimental adotado no protocolo de análise comportamental e neuroquímica.

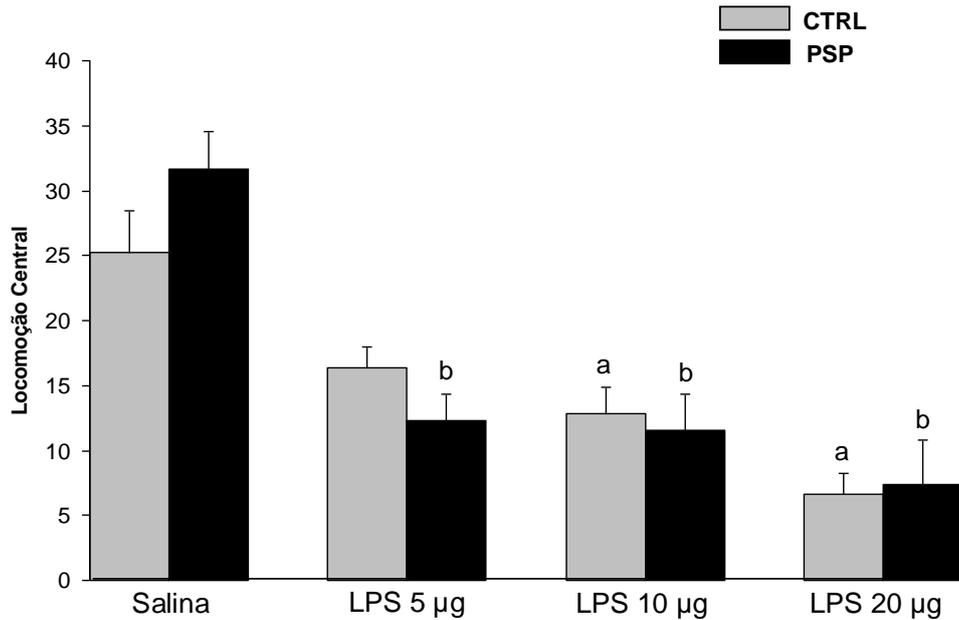
### 5.3.1 Campo aberto

A associação entre a PSP e a administração de LPS acarretou em diversas alterações no comportamento locomotor dos animais. A ANOVA de duas vias revelou um efeito grupo [ $F(1,68)=3,78$ ;  $p<0,05$ ], tratamento [ $F(3,68)=5,00$ ;  $p<0,003$ ] e na interação grupo x tratamento [ $F(3,68)=3,68$ ;  $p<0,01$ ] no tempo gasto para o início do movimento. O teste pos hoc Tukey revelou que o grupo PSP-LPS 20  $\mu\text{g}$  apresentou uma latência para início de movimento elevada em relação aos grupos PSP-Sal ( $p<0,001$ ), PSP-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p<0,02$ ), PSP-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p<0,01$ ) e CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  ( $p<0,01$ ) (Fig. 14).



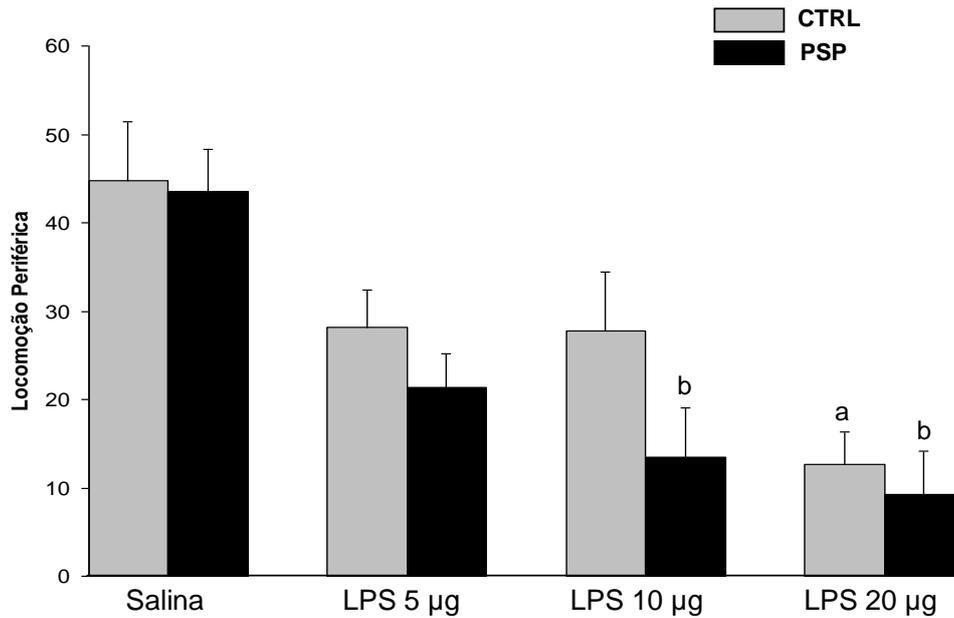
**Figura 14:** Latência para o primeiro movimento do animal no teste de campo aberto. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal, <sup>d</sup> difere do grupo PSP-LPS 5 µg, <sup>f</sup> difere do grupo PSP-LPS 10 µg, <sup>g</sup> difere do grupo CTRL-LPS 20 µg.

Quanto à frequência de locomoção nos quadrantes centrais, a ANOVA revelou apenas um efeito tratamento [ $F(3,72)=25,95$ ;  $p<0,001$ ]. Nos grupos CTRL, o LPS demonstrou ser capaz de reduzir a locomoção central nas doses de 10 µg ( $p<0,05$ ) e 20 µg ( $p<0,001$ ). Entretanto, quando os animais foram privados de sono paradoxal antes dos testes comportamentais, essa redução apresentou-se em todas as doses ( $p<0,001$  para todos os grupos) (Fig. 15).



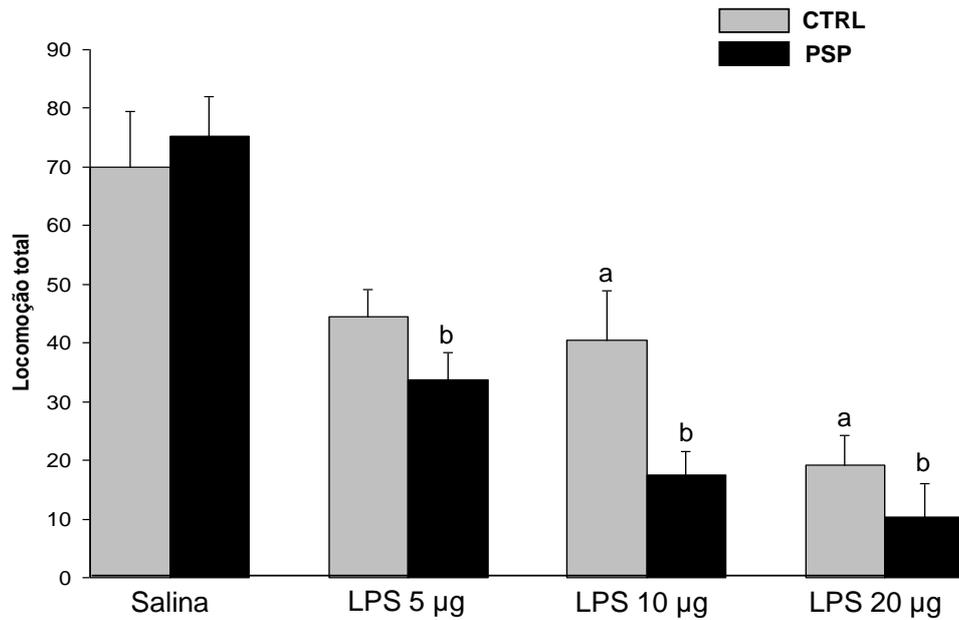
**Figura 15:** Frequência de locomoção nos quadrantes centrais do teste de campo aberto. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

Paralelamente, a frequência de locomoção nos quadrantes periféricos também apresentou somente um efeito tratamento demonstrado pela ANOVA [ $F(3,72)=14,53$ ;  $p<0,001$ ]. Somente os animais CTRL que receberam a dose de 20  $\mu\text{g}$  apresentaram uma redução de locomoção em relação ao seu grupo salina ( $p<0,001$ ). Porém, nos animais PSP, o LPS foi capaz de reduzir a locomoção periférica tanto na dose de 10  $\mu\text{g}$  ( $p<0,01$ ) quanto de 20  $\mu\text{g}$  ( $p<0,001$ ) (Fig. 16).



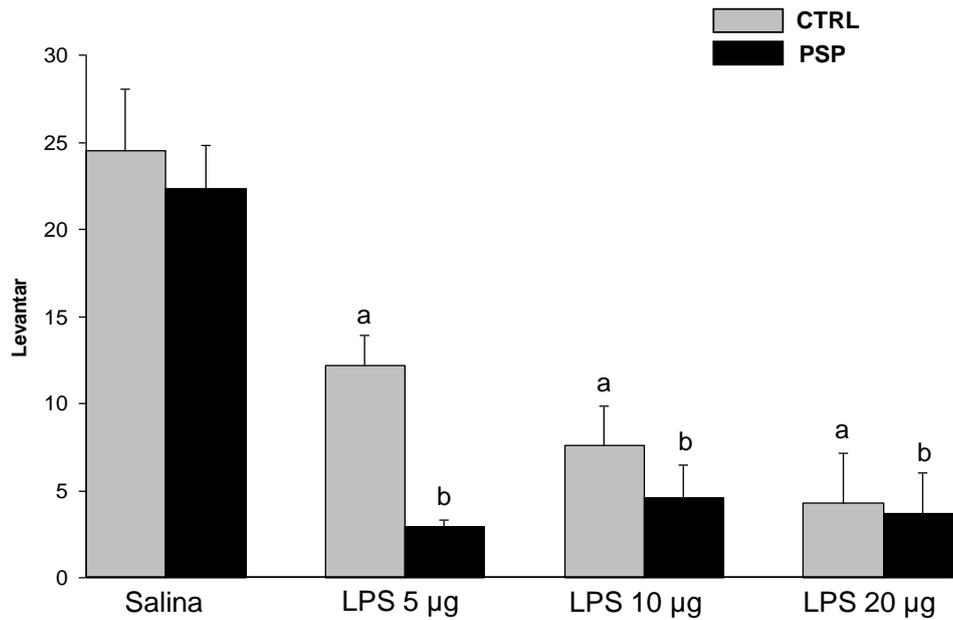
**Figura 16:** Frequência de locomoção dos animais nos quadrantes periféricos do campo aberto. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

A locomoção total, ou seja, a soma da locomoção central com a periférica, apresentou um efeito grupo [F(1,70)=4,15; p<0,05] e tratamento [F(3,70)=29,26; p<0,001] revelado pela ANOVA. O teste de Tukey revelou uma redução da locomoção nas doses de LPS de 10 µg (p<0,05) e 20 µg (p<0,001) nos animais dos grupos CTRL. Nos grupos PSP, entretanto, essa redução da locomoção dos animais foi presente em todas as doses (p<0,001 para todos os grupos) em relação ao grupo PSP-Sal (Fig. 17).



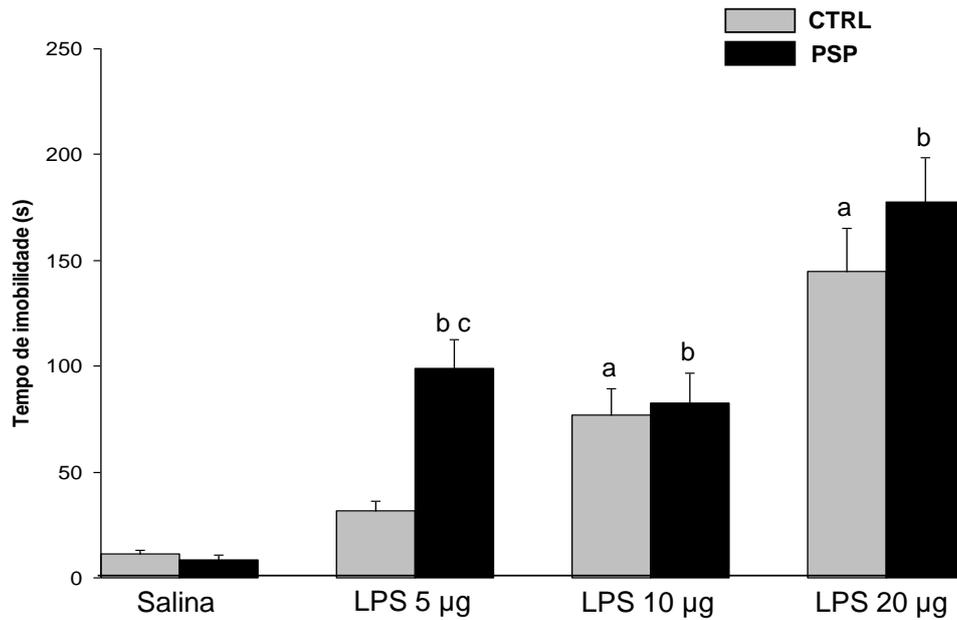
**Figura 17:** Frequência de locomoção total, ou seja, locomoção central + locomoção periférica. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

Juntamente à frequência de locomoção, a frequência de levantar destaca-se como um importante parâmetro motor, bastante relacionado à atividade exploratória. Sendo assim, esse parâmetro demonstrou um efeito grupo [ $F(1,72)=5,19$ ;  $p<0.05$ ] e tratamento [ $F(3,72)=28,75$ ;  $p<0.001$ ]. O tratamento agudo com LPS reduziu a frequência de levantar em todas as doses, tanto nos grupos controle ( $p<0.01$  para todas as doses), quanto nos grupos PSP ( $p<0.001$  para todas as doses) (Fig. 18).



**Figura 18:** Frequência de levantar, ou seja, o animal permanecer somente sobre suas duas patas traseiras. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

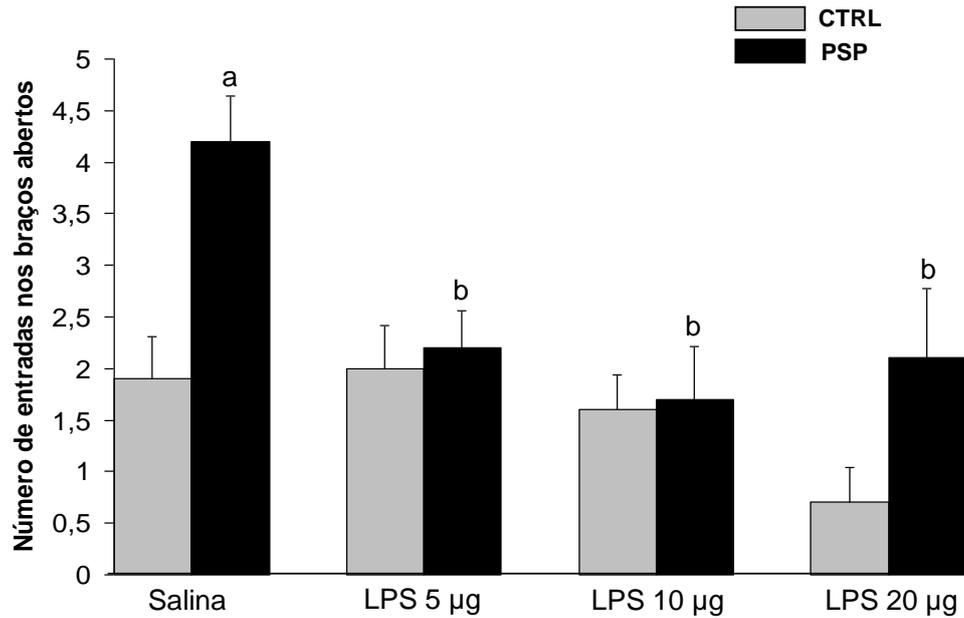
O tempo de imobilidade no teste de campo aberto foi extremamente afetado tanto pela PSP quanto pela administração de LPS, demonstrando um efeito grupo [ $F(1,72)=7,49$ ;  $p<0,001$ ], tratamento [ $F(3,72)=43,93$ ;  $p<0,001$ ], e interação [ $F(3,72)=2,81$ ;  $p<0,05$ ]. Nos grupos CTRL, o tratamento agudo com LPS aumentou o tempo de imobilidade nos animais que receberam as doses de LPS de 10  $\mu\text{g}$  ( $p<0,01$ ) e 20  $\mu\text{g}$  ( $p<0,001$ ). Esse aumento no grupo CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  deu-se inclusive em relação ao grupo CTRL-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p<0,01$ ) e CTRL-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p<0,001$ ). No entanto, nos animais PSP, esse aumento ocorreu em todas as doses ( $p<0,01$ ). O aumento no grupo CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  mostrou-se também em relação ao grupo CTRL-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p<0,01$ ) e CTRL-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p<0,001$ ) e o grupo CTRL-LPS 5  $\mu\text{g}$  também teve valores mais elevados que seu respectivo controle ( $p<0,01$ ) (Fig. 19).



**Figura 19:** Tempo do animal completamente imóvel no teste de campo aberto. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal, <sup>c</sup> difere de CTRL-LPS 5  $\mu$ g.

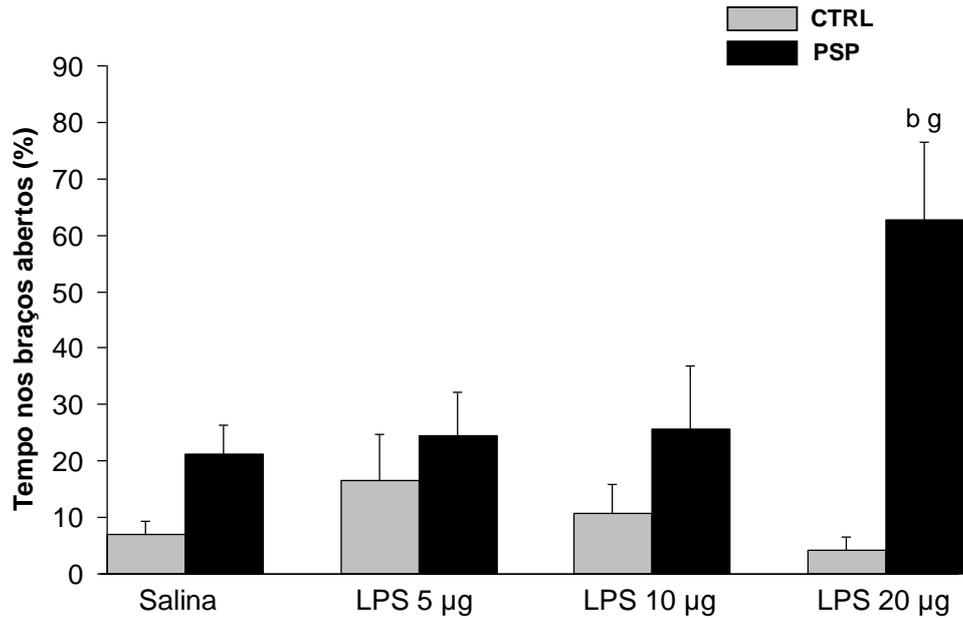
### 5.3.2 Labirinto em cruz-elevado

No número de entradas nos braços abertos do labirinto, a ANOVA demonstrou um efeito grupo [ $F(1,72)=9,89$ ;  $p<0,01$ ], tratamento [ $F(3,72)=5,22$ ;  $p<0,01$ ] e interação [ $F(3,72)=2,71$ ;  $p<0,05$ ]. A PSP aumentou o número de entradas nos braços abertos nos animais tratados com salina ( $p<0,01$ ), entretanto, esse aumento foi revertido pela administração de LPS em todas as suas doses ( $p<0,05$ ) (Fig. 20).



**Figura 20:** Número de entradas nos braços abertos, que representa a atividade exploratória do animal no aparelho de labirinto em cruz-elevado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

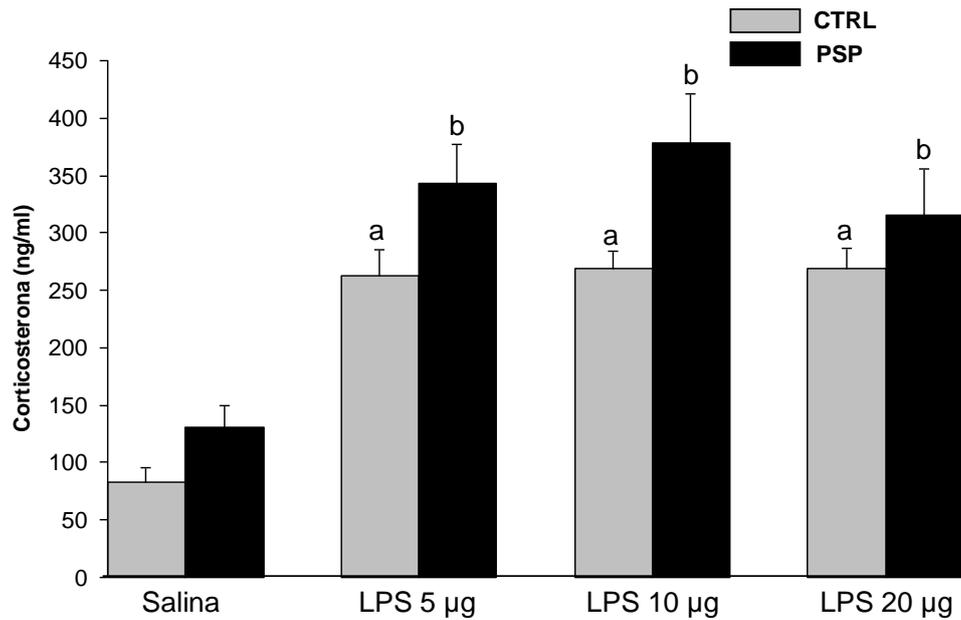
Outro importante parâmetro de ansiedade avaliado no labirinto é o tempo de permanência nos braços abertos que demonstrou um importante efeito grupo [ $F(1,71)=18,15$ ;  $p<0,001$ ] e interação [ $F(3,71)=4,18$ ;  $p<0,01$ ]. Somente o grupo PSP-LPS 20  $\mu$ g apresentou aumento desse parâmetro em relação ao seu grupo salina (PSP-Sal;  $p<0,01$ ) e ao seu grupo controle (CTRL-LPS 20  $\mu$ g;  $p<0,001$ ) (Fig. 21).



**Figura 21:** Porcentagem do tempo despendido dentro dos braços abertos do aparelho, um forte indicativo da ansiedade do animal. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal, <sup>g</sup> difere de CTRL-LPS 20  $\mu$ g.

### 5.3.3 Corticosterona plasmática

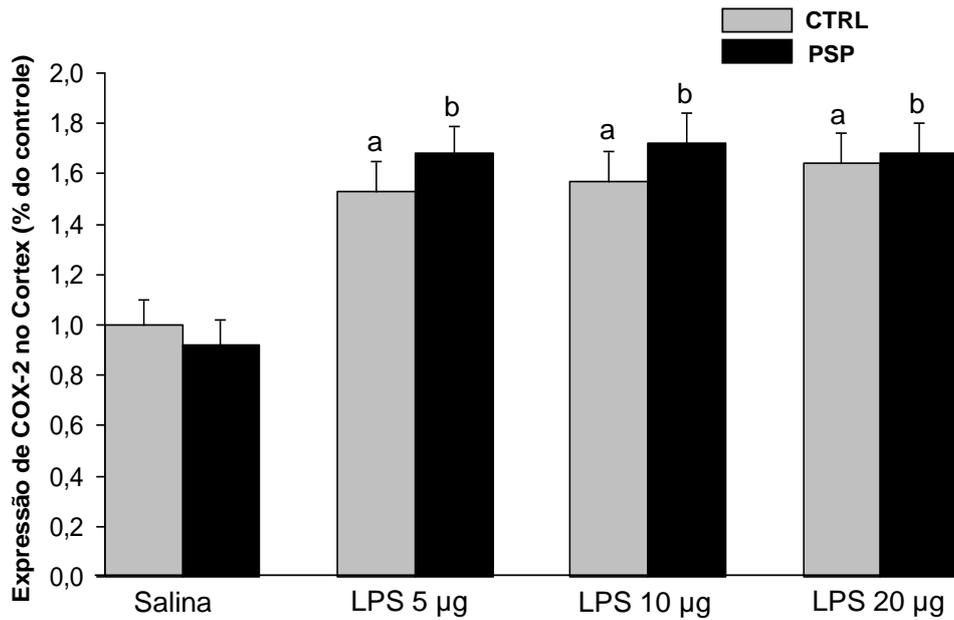
Como demonstrado pela ANOVA, os níveis de corticosterona plasmática tiveram um efeito grupo [ $F(1,66)=5,77$ ;  $p<0,01$ ] e tratamento [ $F(3,66)=17,93$ ;  $p<0,001$ ]. Entretanto, somente os grupos que receberam LPS apresentaram um aumento desses níveis: CTRL-LPS 5  $\mu$ g ( $p<0,01$ ), CTRL-LPS 10  $\mu$ g ( $p<0,01$ ) e CTRL-LPS 20  $\mu$ g ( $p<0,01$ ) comparado com CTRL-Sal e PSP-LPS 5  $\mu$ g ( $p<0,001$ ), PSP-LPS 10  $\mu$ g ( $p<0,001$ ) e PSP-LPS 20  $\mu$ g ( $p<0,05$ ) comparado com PSP-Sal (Fig. 22).



**Figura 22:** Níveis plasmáticos do hormônio corticosterona nos animais PSP e/ou que receberam a injeção de LPS. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

#### 5.3.4 Expressão de COX-2 no córtex e hipotálamo

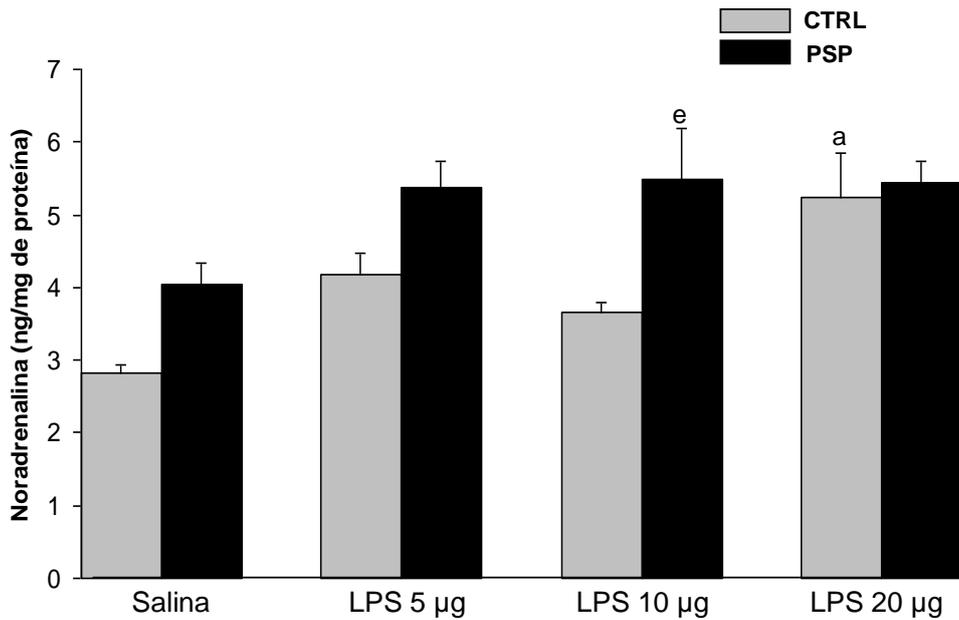
Bandas únicas foram detectadas, apresentando uma esperada massa molecular de 72 kDa em todos os grupos e para as duas regiões testadas nos distintos grupos experimentais. Nenhuma alteração significativa na expressão de COX-2 foi encontrada no hipotálamo. Entretanto, detectou-se um aumento significativo da expressão dessa proteína no córtex dos animais tratados com LPS, independentemente se foram PSP ou CTRL ( $p < 0,05$ ) (Fig. 23).



**Figura 23:** Efeito da privação de sono paradoxal e da administração de LPS na expressão da proteína COX-2 no córtex. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

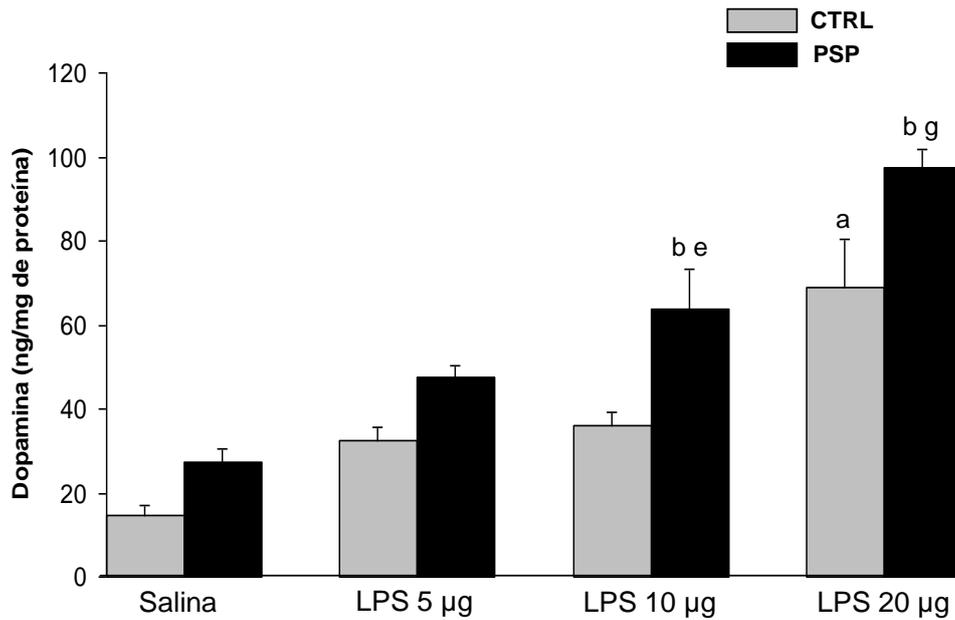
### 5.3.5 Concentração de monoaminas e metabólitos no estriado

A noradrenalina (NA) sofreu um significativo efeito grupo [ $F(1,70)=15,44$ ;  $p<0,001$ ] e tratamento [ $F(3,70)=8,37$ ;  $p<0,001$ ] como revelado pela ANOVA de duas vias. Nos animais CTRL, somente o grupo que recebeu a dose de LPS de 20  $\mu$ g apresentou um aumento significativo em relação ao grupo injetado com salina ( $p<0,001$ ). Nos animais PSP, a concentração de NA encontrou-se aumentada nos animais que receberam LPS na dose de 10  $\mu$ g em relação ao seu grupo CTRL ( $p<0,05$ ) (Fig. 24).



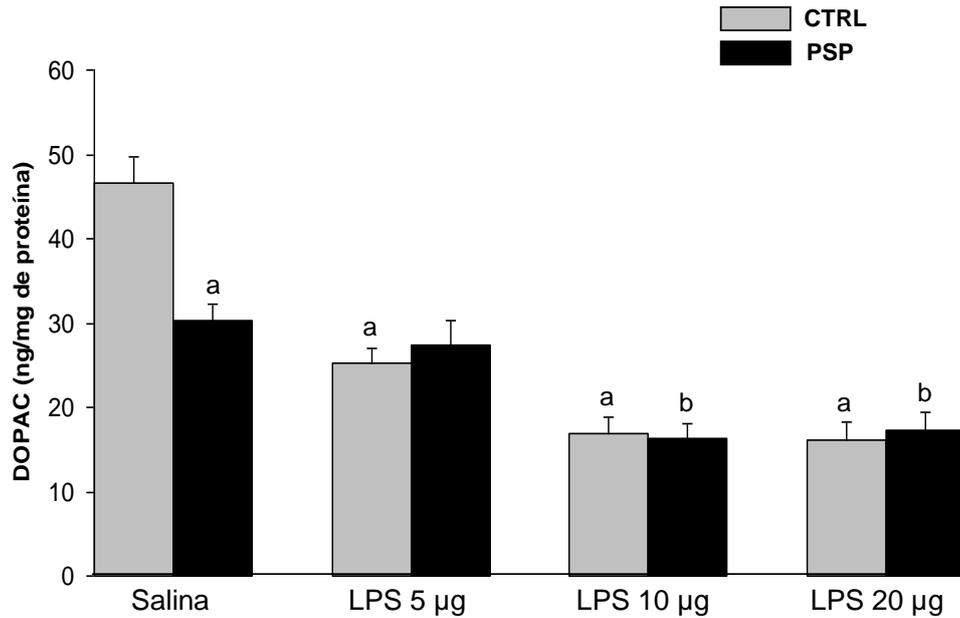
**Figura 24:** Concentração de noradrenalina no estriado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>e</sup> difere do grupo CTRL-LPS 10  $\mu$ g.

A ANOVA demonstrou efeito grupo [ $F(1,70)=26,503$ ;  $p<0,001$ ] e tratamento [ $F(3,70)=41,63$ ;  $p<0,001$ ] nas concentrações estriatais de dopamina (DA). O teste de Tukey revelou que o grupo CTRL-LPS 10  $\mu$ g apresentou um aumento significativo em relação ao grupo CTRL-Sal ( $p<0,001$ ). Entretanto, nos animais PSP, esse aumento foi encontrado tanto na dose de 10  $\mu$ g ( $p<0,001$ ) quanto na dose de 20  $\mu$ g ( $p<0,001$ ) em relação ao grupo PSP-Sal. Ambos os grupos PSP-LPS 10  $\mu$ g ( $p<0,05$ ) e PSP-LPS 20  $\mu$ g ( $p<0,01$ ) apresentaram aumento também com relação ao seus respectivos CTRL (Fig. 25).



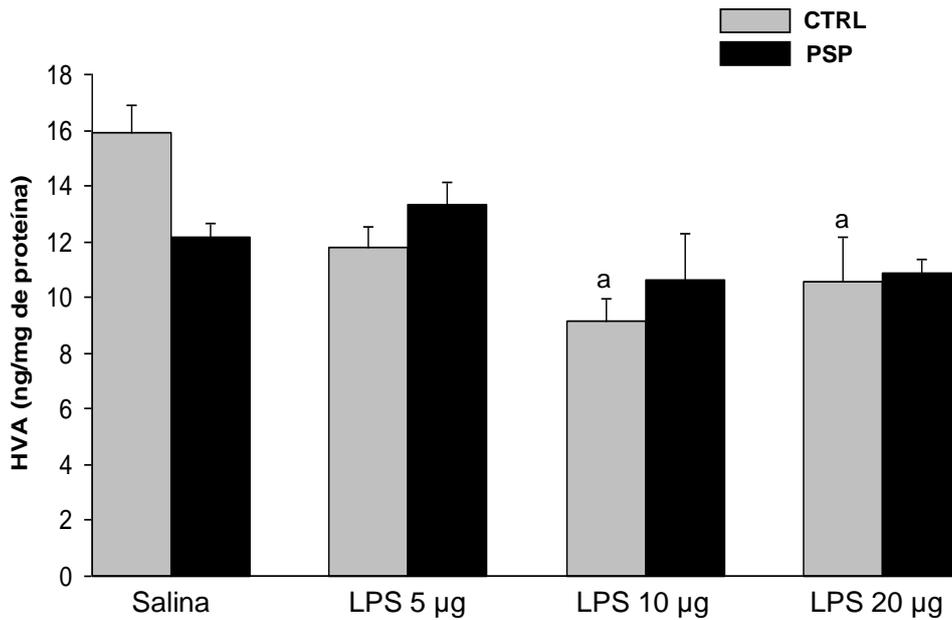
**Figura 25:** Concentração de dopamina no estriado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal, <sup>e</sup> difere do grupo CTRL-LPS 10 µg, <sup>g</sup> difere do grupo CTRL-LPS 20 µg.

Em relação ao ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), um importante produto da metabolização da DA, a ANOVA demonstrou efeito grupo [ $F(1,70)=4,47$ ;  $p<0,05$ ], tratamento [ $F(3,70)=41,19$ ;  $p<0,001$ ] e interação [ $F(3,70)=7,27$ ;  $p<0,001$ ]. Comparados com o grupo CTRL-Sal, tanto a PSP ( $p<0,001$ ) quanto as doses de LPS de 5 µg, 10 µg, e 20 µg ( $p<0,001$  para todos os casos) reduziram as concentrações desse metabólito. Quando comparados com o grupo PSP-Sal, somente os grupos PSP-LPS 10 µg ( $p<0,001$ ) e PSP-LPS 20 µg ( $p<0,001$ ) apresentaram redução do DOPAC (Fig. 26).

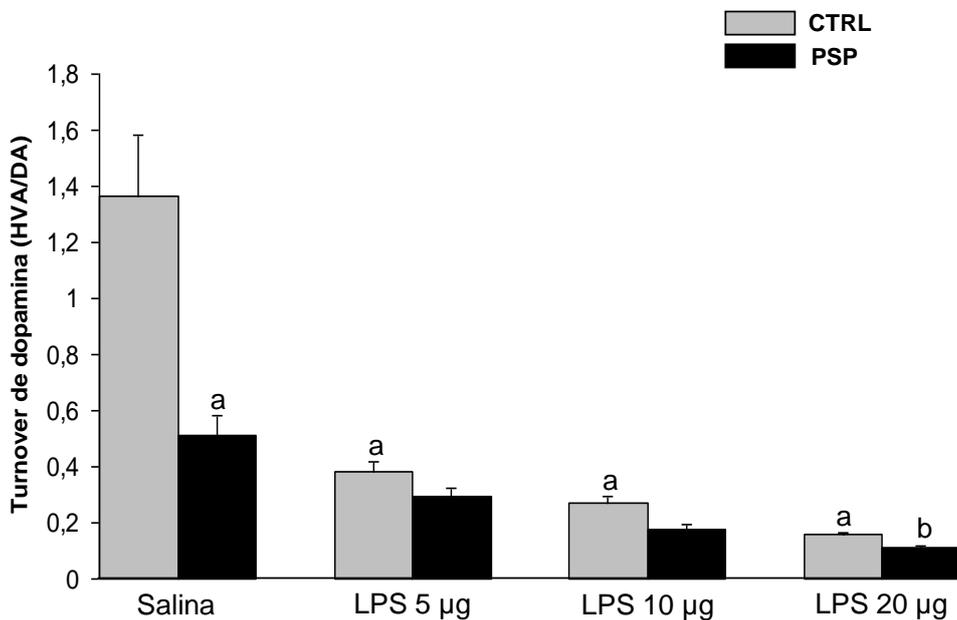


**Figura 26:** Concentração do metabólito de dopamina ácido 3,4-dihidroxi-fenilacetico, o DOPAC. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

Um outro metabólito da DA, o ácido homovanílico (HVA) teve um significativo efeito tratamento [ $F(3,70)=6,80$ ;  $p<0,001$ ] e interação [ $F(3,70)=3,19$ ;  $p<0,05$ ]. Nos animais CTRL, as doses de LPS de 10  $\mu$ g ( $p<0,001$ ) e 20  $\mu$ g ( $p<0,01$ ) reduziram significativamente as concentrações de HVA (Fig. 27). A razão HVA/DA, um importante indicativo da taxa de renovação (*turnover*) dopaminérgica, apresentou efeito grupo [ $F(1,70)=19,98$ ;  $p<0,001$ ], tratamento [ $F(3,70)=36,30$ ;  $p<0,001$ ] e interação [ $F(3,70)=10,49$ ;  $p<0,001$ ]. Tanto a PSP quanto todas as doses de LPS ( $p<0,001$  em todos os casos) reduziram significativamente essa razão em relação ao grupo CTRL-Sal. Somente o grupo PSP-LPS 20  $\mu$ g apresentou redução desse valor em relação ao grupo PSP-Sal ( $p<0,05$ ) (Fig. 28).

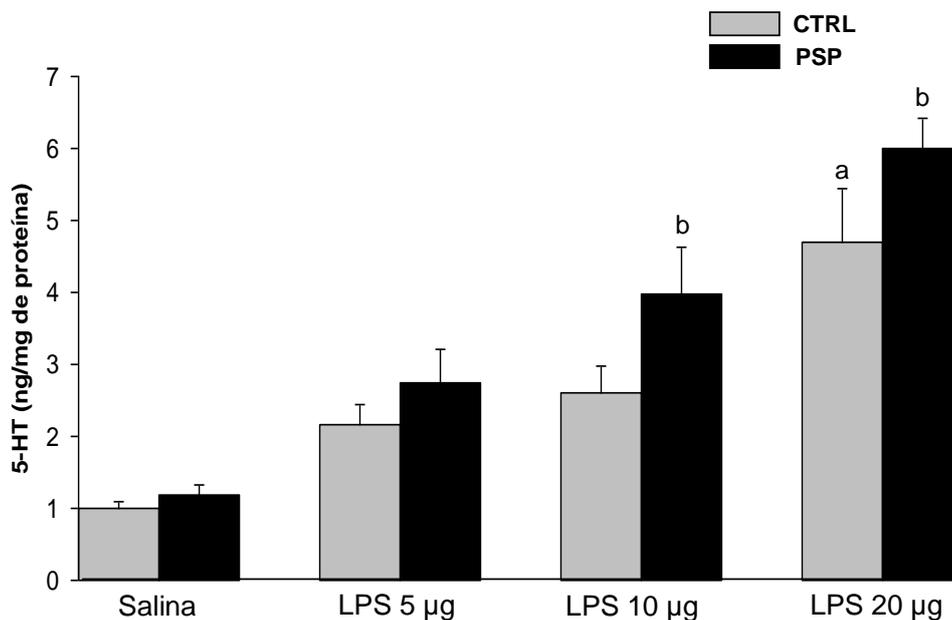


**Figura 27:** Concentração do ácido homovanílico, outro metabólito ativo da dopamina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

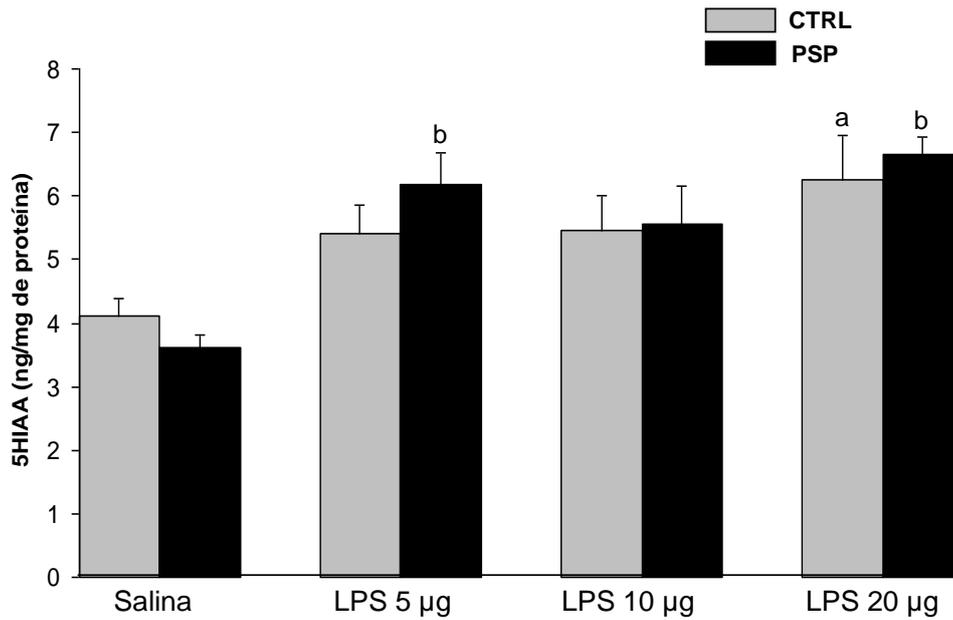


**Figura 28:** Razão HVA/DA, um forte indicativo da taxa de renovação (*turnover*) da dopamina no estriado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

A concentração estriatal de serotonina (5-HT) demonstrou efeito grupo [F(1,68)=7,02;  $p<0,01$ ] e tratamento [F(3,68)=29,89;  $p<0,001$ ]. O grupo CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  apresentou aumento da concentração de 5-HT em relação ao grupo CTRL-Sal ( $p<0,001$ ). Entretanto, nos animais PSP, esse aumento ocorreu tanto na dose de 10  $\mu\text{g}$  ( $p<0,001$ ) quanto na doses de 20  $\mu\text{g}$  ( $p<0,001$ ) (Fig. 29). A ANOVA também demonstrou um importante efeito tratamento [F(3,70)=11,63;  $p<0,001$ ] nas concentrações do metabólito da 5-HT, o ácido 5-hidroxiindoleacético (5HIAA). Esse metabólito encontrou-se aumentado no grupo CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  em comparação ao grupo CTRL-Sal ( $p<0,05$ ). Um aumento similar foi encontrado nos animais PSP nas doses de 5  $\mu\text{g}$  ( $p<0,01$ ) e 20  $\mu\text{g}$  ( $p<0,001$ ) em relação ao grupo PSP-Sal (Fig. 30).

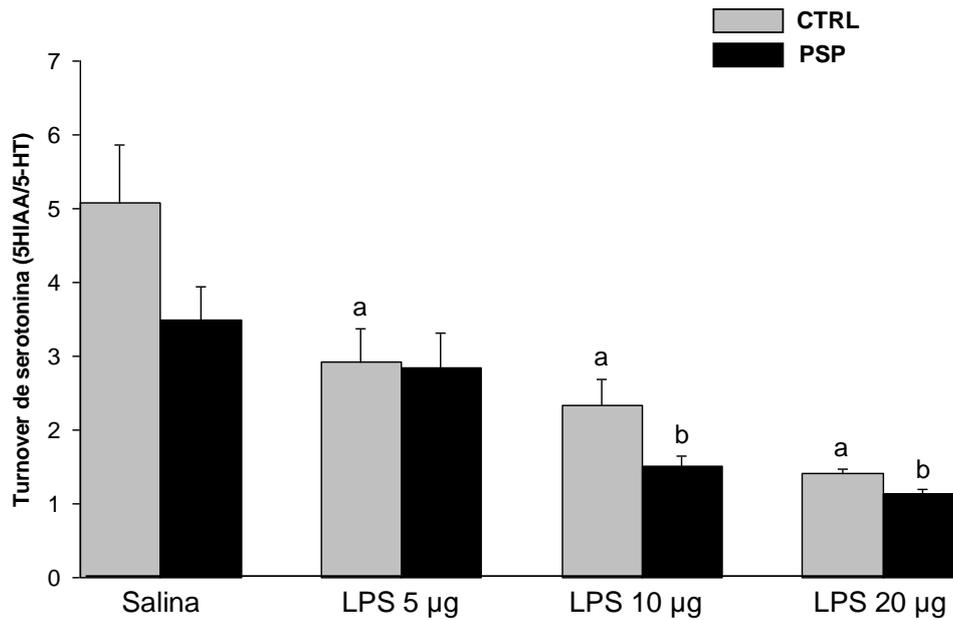


**Figura 29:** Concentração de serotonina no estriado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.



**Figura 30:** Concentração do metabólito da serotonina, o ácido 5-hidroxiindoleacético (5HIAA). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

O *turnover* de 5-HT, indicado pela razão 5HIAA/5-HT, apresentou efeito grupo [ $F(1,68)=5,51$ ;  $p<0,05$ ] e tratamento [ $F(3,68)=19,57$ ;  $p<0,001$ ], como demonstrado pela ANOVA. O tratamento com LPS reduziu esse razão nos animais CTRL em todas as doses testadas ( $p<0,01$  para todas as doses). Nos animais PSP, essa redução foi encontrada apenas nas doses de 10  $\mu$ g ( $p<0,05$ ) e 20  $\mu$ g ( $p<0,01$ ) em relação ao seu grupo salina (Fig. 31).



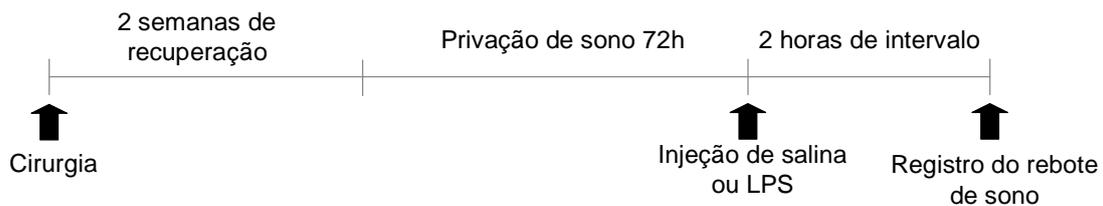
**Figura 31:** Razão 5HIAA/5-HT, um forte indicativo da taxa de renovação (*turnover*) da serotonina no estriado. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal.

#### 5.4 Experimento 4: Associação entre a PSP e administração de LPS na recuperação de sono de camundongos

Uma vez que a PSP provoca diversas alterações na resposta comportamental e neuroquímica ao LPS, realizamos esse experimento com a finalidade de avaliar como a associação desses dois fatores afeta a recuperação de sono após a PSP.

Após o período de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos ao protocolo de PSP ou permaneceram em suas gaiolas-moradias. No dia do experimento, os animais (n=5/grupo) receberam injeção de LPS (doses de 5, 10 ou 20 µg) ou salina. Em seguida da injeção, os animais retornaram às suas respectivas gaiolas por um intervalo de duas horas antes do registro eletrocorticográfico de sono. Os animais foram submetidos ao registro da recuperação de sono (EMBLA Medical digital polygraph, Reykjavik,

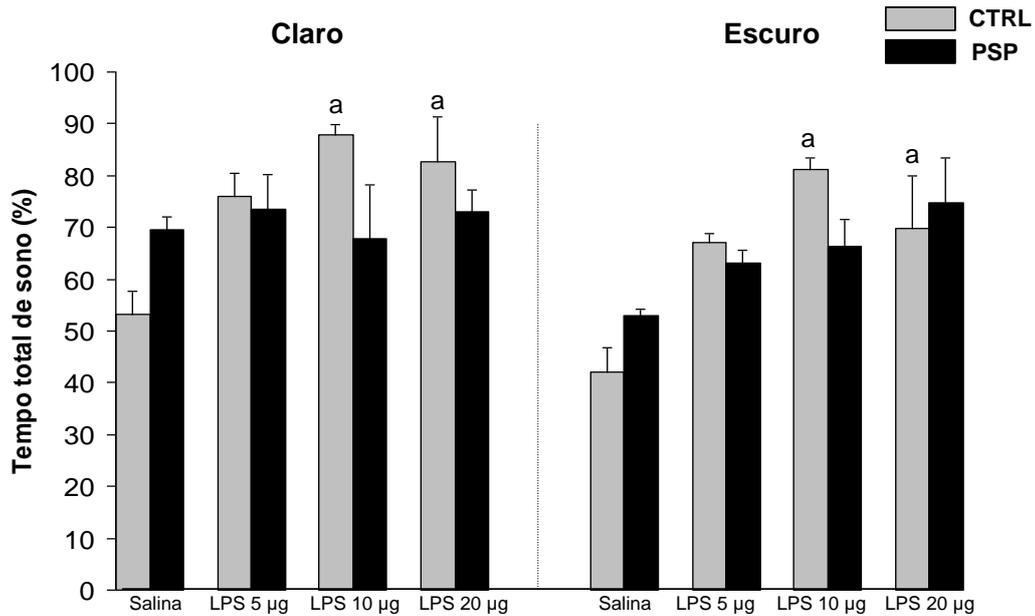
Islândia) durante 48 horas e os seguintes parâmetros foram analisados: tempo total de sono (porcentagem do tempo de sono em relação ao tempo de registro), tempo de SOL (porcentagem do tempo de SOL em relação ao tempo de registro) e tempo de sono paradoxal (porcentagem do tempo de sono paradoxal em relação ao tempo de registro).



**Figura 32:** Representação esquemática do desenho experimental adotado no protocolo de registro de sono.

#### 5.4.1 Tempo total de sono

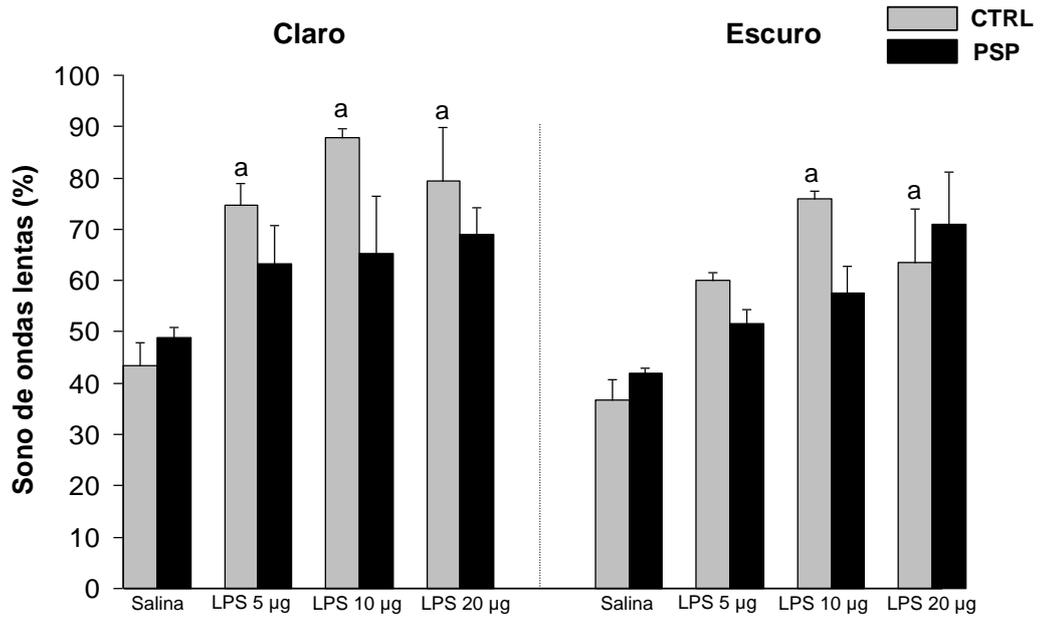
A ANOVA de medidas repetidas revelou significativo efeito grupo [F(7,26)=4,81;  $p < 0,001$ ] e tempo [F(1,26)=23,55;  $p < 0,001$ ] durante o período claro. O tratamento com LPS nas doses de 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,001$ ) e 20  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,001$ ) nos animais CTRL aumentou significativamente os tempo de sono no dia 1. Ainda, essas alterações persistiram durante o período escuro do dia 1 de recuperação nos grupos CTRL-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,001$ ) e CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,01$ ). Essas alterações retornaram aos seus valores basais no segundo dia de rebote, exceto pela diferença entre os grupos PSP-Sal e PSP-LPS 20  $\mu\text{g}$  ( $p < 0,01$ ). A ANOVA indicou efeito grupo [F(7,25)=9,12;  $p < 0,0001$ ] e tempo [F(1,25)=24,45;  $p < 0,001$ ] durante o período escuro (Fig. 33).



**Figura 33:** Tempo total de sono na fase clara e escura do dia 1 do período rebote. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal.

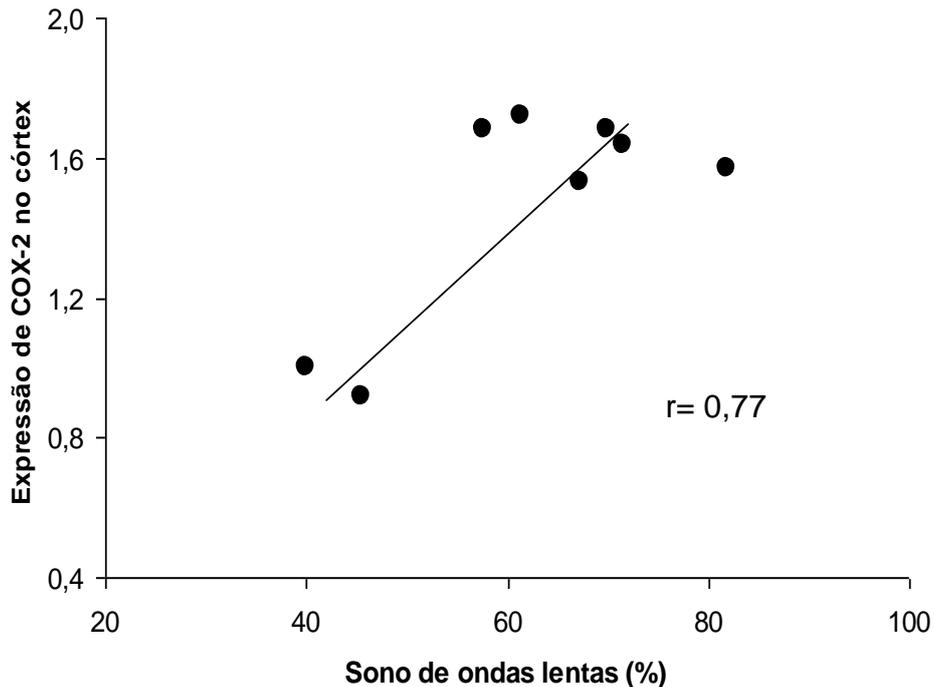
#### 5.4.2 Sono de ondas lentas

No tempo total de SOL no período claro, a ANOVA demonstrou efeito grupo [F(7,26)=7,25;  $p < 0,001$ ], tempo [F(1,26)=23,53;  $p < 0,001$ ] e interação grupo X tempo [F(7,26)=2,37;  $p < 0,05$ ]. Nos grupos CTRL, todas as doses de LPS aumentaram o tempo de SOL no período claro do dia 1: 5 µg ( $p < 0,01$ ), 10 µg ( $p < 0,001$ ), e 20 µg ( $p < 0,01$ ). Durante o período escuro, foi revelado pela ANOVA efeito grupo [F(7,25)=9,79;  $p < 0,001$ ] e tempo [F(1,25)=17,53;  $p < 0,001$ ]. No dia 1, os grupos CTRL-LPS 10 µg ( $p < 0,001$ ) e CTRL-LPS 20 µg ( $p < 0,05$ ) apresentaram maior tempo em SOL do que o grupo CTRL-Sal (Fig. 34). No dia 2, o grupo PSP-LPS 20 µg apresentou ainda valores maiores que o grupo PSP-Sal ( $p < 0,01$ ). Todas as outras alterações na quantidade de SOL retornaram aos valores basais no segundo dia de registro.



**Figura 34:** Tempo total de sono de ondas lentas na fase clara e escura do dia 1 do período rebote. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal.

Ainda, essas alterações no SOL no primeiro dia de rebote de sono encontradas nos animais que receberam LPS correlacionam-se fortemente com a expressão protéica de COX-2 no córtex, encontrada no experimento 2 ( $r=0,77$ ) (Fig. 35).



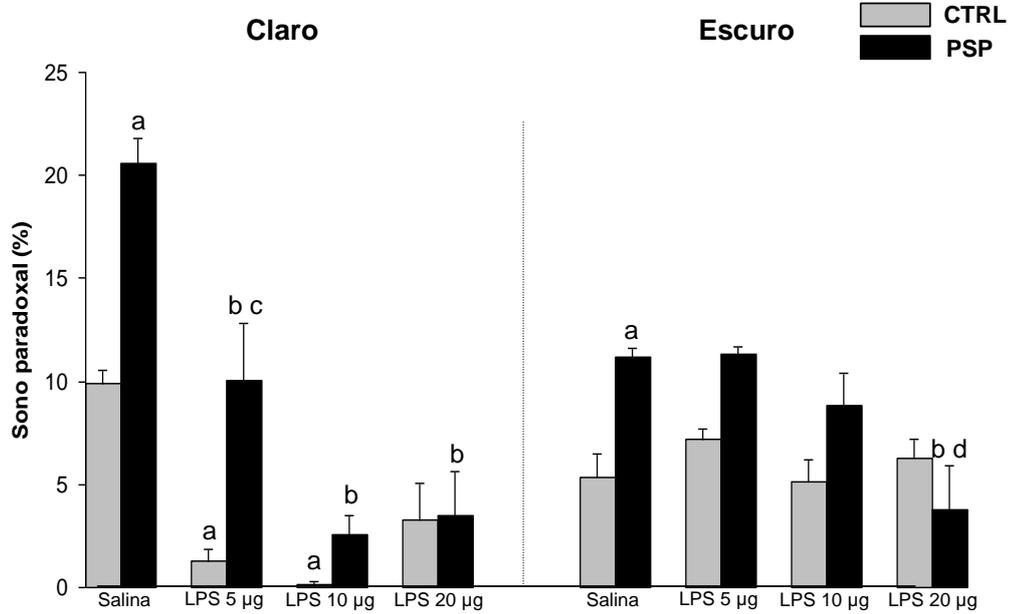
**Figura 35:** Correlação positiva entre a expressão de COX-2 no córtex e o tempo de sono de ondas lentas no dia 1 de rebote.

### 5.4.3 Sono paradoxal

A análise do tempo de SP durante o período claro demonstrou um significativo efeito grupo [ $F(7,26)=13,81$ ;  $p<0,001$ ] e interação [ $F(7,26)=13,85$ ;  $p<0,001$ ]. A administração de LPS nas doses de 5  $\mu\text{g}$  ( $p<0,01$ ) e 10  $\mu\text{g}$  ( $p<0,001$ ) reduziu significativamente a quantidade de SP no dia 1 em relação ao grupo salina. Na recuperação após a PSP, o grupo PSP-Sal apresentou um aumento de 107% no SP no dia 1 ( $p<0,001$ ). Em contraste, todos os grupos que receberam LPS tiveram uma redução do SP em relação ao grupo PSP-Sal ( $p<0,001$  em todas as doses) (Fig. 36). No dia 2, todos os valores retornaram aos níveis basais.

Durante o período escuro, a ANOVA revelou um significativo efeito grupo [ $F(7,25)=3,12$ ;  $p<0,001$ ]. No dia 1, o grupo PSP-Sal permaneceu com valores elevados em relação ao grupo CTRL-Sal ( $p<0,01$ ). Ainda, a redução na

duração do SP no dia 1 persistiu no grupo PSP-LPS 20 µg, que apresentou valores inferiores aos grupos PSP-Sal ( $p < 0,01$ ) e PSP-LPS 5 µg ( $p < 0,05$ ) (Fig. 36).



**Figura 36:** Tempo total de sono paradoxal na fase clara e escura do dia 1 do período rebote. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. <sup>a</sup> difere do grupo CTRL-Sal, <sup>b</sup> difere do grupo PSP-Sal, <sup>c</sup> difere do grupo CTRL-LPS 5 µg, <sup>d</sup> difere do grupo PSP-LPS 5 µg.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Metodologia de privação de sono paradoxal em camundongos

O método das plataformas é uma metodologia muito bem estabelecida na literatura para a avaliação dos efeitos da PSP. Ele baseia-se no princípio da atonia muscular presente durante os eventos de SP, que fazem com que os animais acordem ao encostar o focinho ou outra parte do corpo na água (Jouvet et al., 1964).

Os primeiros estudos empregando esse método em ratos utilizavam plataformas únicas para produzir a PSP. Entretanto, foi demonstrado que a plataforma única produz tanto isolamento social quanto restrição de movimento, estressores que podem confundir-se aos efeitos da PSP (Suchecki et al., 1998; Suchecki e Tufik, 2000; Suchecki et al., 2002). No intuito de melhor estudar esse método, foi desenvolvido na década de 90 o método das plataformas múltiplas, no qual animais são alojados juntos em uma quantidade excedente de plataformas sobre a água, desta forma permitindo interação social com os outros animais e livre movimentação entre as plataformas (Nunes Junior et al., 1994).

Mais recentemente, foi demonstrado que a metodologia de plataformas múltiplas aplicada em ratos por 96 horas é capaz de produzir supressão completa do SP e ainda comprometer significativamente o SOL. Uma vez que os animais são retirados da PSP, eles apresentam uma recuperação de sono caracterizada por um rebote intenso de SP (Morden et al., 1967; Machado et al., 2004). Em camundongos, nossos resultados e um estudo prévio (Silva et al., 2004) demonstram que esse protocolo por 72 horas também foi capaz de suprimir o SP e ainda reduzir de forma significativa o SOL. Desta forma, tanto

para ratos quanto para camundongos, a metodologia de plataformas múltiplas pode ser chamada de privação de sono paradoxal (PSP).

## **6.2 Alterações imunológicas decorrentes da privação de sono**

Nossos resultados demonstram que a PSP não conseguiu afetar de forma significativa a concentração e a migração de células imunológicas induzidas pela administração de LPS. No entanto, nos animais tratados com salina, a PSP foi capaz de provocar prejuízos significativos na quantidade de linfócitos na corrente sanguínea e também de todos os subtipos linfocitários no baço, sem afetar essas células no peritônio e nos linfonodos inguinais.

Com relação à linfopenia induzida pela PSP, nossos achados corroboram com diversos dados da literatura em que a redução do número de linfócitos circulantes é relatada (Boyum et al., 1996; Velazquez-Moctezuma et al., 2004; Gundersen et al., 2006; Ruiz et al., 2007; Zager et al., 2007). Para o nosso conhecimento, nosso estudo é o primeiro a relatar que essas alterações na quantidade de linfócitos não se restringem à corrente sanguínea, mas também à órgãos linfóides, como o baço. Contudo, nenhuma alteração foi encontrada nos linfonodos inguinais (sítio regional de apresentação de antígeno) e no peritônio (local da administração), indicando que essa redução das células após a PSP na corrente sanguínea e no baço não foi provocada por alterações na migração dessas células. Nesse sentido, podemos sugerir algum mecanismo de morte celular dos linfócitos provocada pela PSP, uma vez que mecanismos de apoptose já foram relatados em células do SNC (Biswas et al., 2006).

Embora a PSP tenha efeitos característicos na concentração de células imunológicas nos animais tratados com salina, nosso protocolo não foi capaz de replicar esses resultados em nenhuma das doses de LPS utilizadas nesse experimento. Uma possível explicação para essa discrepância é que o LPS tenha atingido seu efeito teto nas doses aplicadas no presente estudo, embora tenha sido utilizada uma dose muito menor àquelas utilizadas no intuito de induzir o comportamento doentio.

Assim, podemos concluir que a PSP provoca efeitos expressivos na concentração de linfócitos de animais que não foram desafiados imunologicamente, porém não é suficiente para afetar a concentração e/ou migração de células imunológicas induzidas por grandes doses de LPS.

### **6.3 Papel do sono na resposta comportamental e neuroquímica ao LPS**

Nossos resultados comprovam que o sono e/ou PSP exerce uma forte influência na resposta a um estímulo imunológico específico, no nosso estudo, o LPS. O principal efeito da PSP foi o aumento da susceptibilidade à imobilidade induzida pelo LPS, ou seja, os animais PSP se tornam mais sensíveis a doses mais baixas de LPS. Esse aumento da imobilidade pode inclusive afetar o teste de ansiedade. Quando os animais foram permitidos recuperar o sono, o LPS suprimiu o rebote de SP apresentado pelos animais desafiados com salina. As análises neuroquímicas indicam que essas alterações comportamentais são provocadas principalmente por mudanças na neurotransmissão dopaminérgica e expressão de proteínas inflamatórias no SNC.

Uma importante limitação da metodologia de PSP é o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, ocorrência intrínseca a procedimentos estressantes (Andersen et al., 2004; 2005). No entanto, nosso estudo mostra que a PSP não alterou os níveis de corticosterona plasmática do grupo salina, indicando que os resultados encontrados são causados pela perda de sono *per se*, embora a PSP apresente um componente estressor inerente. Ainda, as alterações na secreção de corticosterona foram observadas apenas nos grupos tratados com LPS, independentemente se foram privados de sono ou não. Esse achado corrobora com dados prévios da literatura que comprovam a capacidade de um desafio imunológico de ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Turnbull e Rivier, 1995; Beishuizen e Thijs, 2003), e enfatiza também a importante conexão entre o sistema nervoso e imunológico.

O comportamento motor dos animais tratados com LPS apresentou uma sensível alteração no teste de campo aberto, caracterizada por diminuição da locomoção e levantar, e aumento do tempo de imobilidade, corroborando com dados da literatura que descrevem um marcante efeito supressor da atividade exploratória e interação social provocados por ativação imunológica (Kozak et al., 1994; Swiergiel e Dunn, 2007). Nossas análises moleculares nos permitem associar que essa redução do comportamento motor pelo LPS foi causada pela redução da neurotransmissão dopaminérgica ao longo da via nigroestriatal, a principal via de controle do comportamento motor. Além disso, o sono demonstrou um papel fundamental para a resposta adequada a um estímulo imunológico, uma vez que os animais PSP apresentaram uma potencialização desse prejuízo motor e se tornaram suscetíveis às doses mais baixas de LPS. Com base nos presentes achados, é possível inferir que essa sensibilização

dos animais é provocada por um efeito sinérgico entre a PSP e a exposição ao LPS, haja vista que ambas as condições são capazes de reduzir o *turnover* dopaminérgico de uma forma dose-dependente.

No teste de labirinto em cruz-elevado, nossos resultados demonstraram que a PSP ocasiona um maior número de entradas nos braços abertos, comprovando o efeito ansiolítico da PSP em ratos (Suchecki et al., 2002). Entretanto, o efeito ansiogênico não foi observado nos animais exclusivamente administrados com LPS. Dentre os muitos fatores que podem influenciar um teste de ansiedade como o teste utilizado no estudo, a liberação de NA no SNC se destaca (Morilak et al., 2005). Desta forma, podemos atribuir que a falta de resposta comportamental ao LPS no teste de labirinto é consistente com a liberação de NA encontrada nesses animais. Ainda, a intensa redução da atividade exploratória provocada pelo LPS, juntamente com diferenças de linhagens de camundongos e sorotipos de LPS utilizados, podem contribuir também para essa diferença entre os nossos resultados e os já descritos em outros estudos (Lacosta et al., 1999; Swiergiel e Dunn, 2007), uma vez que esses fatores são capazes de alterar a liberação de NA.

Quando os animais foram privados de sono antes dos testes comportamentais, o LPS foi capaz de reverter o efeito ansiolítico da PSP, reduzindo o número de entradas nos braços abertos. Por outro lado, a diferença entre os grupos CTRL e PSP no tempo de permanência dos braços abertos apresentou um aumento dose-dependente, enfatizando a importância do comportamento motor no teste de labirinto em cruz-elevado (Cruz et al., 1994; Rodgers e Johnson, 1995). Assim, podemos assumir que a atividade

exploratória suprimida pelo LPS desempenhou papel fundamental também no teste de ansiedade aplicado.

Outro importante aspecto abordado no presente trabalho são as alterações no padrão de sono induzidas por estímulos imunológicos e a possibilidade dessas alterações serem afetadas pela PSP. Estudos anteriores, assim como nossos resultados, demonstram que a administração de LPS, bem como de citocinas pró-inflamatórias isoladas, é capaz de aumentar significativamente o tempo de SOL (Lancel et al., 1995; Mullington et al., 2000; Schiffelholz e Lancel, 2001). Por outro lado, a PSP é capaz de desencadear um rebote de SP, uma resposta normal ao desequilíbrio homeostático provocado pela PSP (Machado et al., 2004).

Quando os animais são expostos ao LPS após a PSP, nenhuma alteração foi encontrada no tempo total de sono e no SOL durante o rebote de sono. No entanto, a administração de LPS foi capaz de comprometer significativamente o SP independentemente da dose utilizada, provocando assim uma supressão do rebote de SP. Nossa hipótese é que o LPS inibiu o rebote de SP através da redução da função dopaminérgica. Essa hipótese vai ao encontro de diversos estudos do nosso laboratório e da literatura que relatam o papel fundamental do sistema dopaminérgico na regulação do sono, principalmente SP (Tufik et al., 1978; Lena et al., 2005; Dzirasa et al., 2006; Dahan et al., 2007; Lima et al., 2007; 2008).

Podemos ainda ressaltar que nem a PSP nem a administração de LPS resultaram em morte dos animais nos dois dias de recuperação de sono. No entanto, quando os animais foram PSP antes de serem expostos ao LPS, a mortalidade dos animais aumentou para 20% e 40%, nas doses de 10 µg e 20

µg, respectivamente. Assim, é interessante destacar que um organismo privado de sono se torna mais susceptível a infecções (Everson e Toth, 2000), e que essa exposição a um desafio imunológico provoca inibição do rebote de sono, que por sua vez, resulta em um tempo de PSP ainda maior, desencadeando um círculo vicioso muito difícil de ser revertido. Tomadas em conjunto essas evidências, podemos sugerir que a PSP aumenta a susceptibilidade do organismo a um possível choque endotóxico provocado pelo LPS, e ainda fortalecem a hipótese que o sono é essencial para uma resposta imunológica adequada.

É bem conhecido também que a cascata da resposta inflamatória desencadeada pelo LPS é capaz de induzir a expressão de proteínas inflamatórias no CNS, dentre elas, a COX-2. A COX-2 é uma enzima capaz de catalisar a síntese de prostaglandinas no CNS e modular diversas alterações comportamentais (Terao, Matsumura, Yoneda et al., 1998; Jain et al., 2001). No nosso estudo, a expressão de COX-2 no córtex encontrou-se aumentada nos animais tratados com LPS, independentemente se foram ou não privados de sono. Apesar de existir diversos estudos que comprovam a participação dessa enzima nas alterações do comportamento alimentar induzidas por LPS (Johnson et al., 2002; Swiergiel e Dunn, 2002; Dunn et al., 2006), nós conseguimos demonstrar uma forte correlação entre a expressão cortical de COX-2 e o tempo de SOL no primeiro dia de rebote. Esse achado corrobora com dados prévios que destacam a participação da COX-2 e de sua cascata inflamatória na expressão do SOL espontâneo e induzido por estímulos imuno-inflamatórios (Terao, Matsumura e Saito, 1998; Terao, Matsumura, Yoneda et al., 1998; Yoshida et al., 2003). Ainda, essas alterações no SOL provocadas

pela COX-2 podem também influenciar a supressão do rebote de SP nos animais PSP.

Sabe-se que o sistema imunológico comunica-se com o sistema nervoso através de diversos mediadores químicos que desencadeiam alterações na neurotransmissão central (Dunn, 2006). Entretanto, nossas análises dopaminérgicas levantam uma questão de suma importância: uma vez que o LPS inibe tanto o comportamento motor quanto o rebote de SP após a PSP, seria o LPS capaz de provocar um antagonismo de receptores dopaminérgicos no SNC? Diversos estudos relatam que antagonistas dopaminérgicos como o haloperidol reduzem a atividade locomotora (Conceicao e Frussa-Filho, 1996) e suprimem o rebote de SP (Lima et al., 2008), resultados muito semelhantes aos efeitos do LPS. Nossa hipótese é que esse possível bloqueio dos receptores dopaminérgicos pode atuar sinergisticamente com a redução do *turnover* de DA provocando todas essas alterações comportamentais quando o LPS é administrado em animais PSP.

Em suma, nossos resultados nos permitem sugerir que o sono exerce um papel fundamental como modulador da resposta a um estímulo imunológico. O sono atua principalmente regulando mudanças na neurotransmissão central que provocam alterações comportamentais. Assim, nosso estudo fornece novos achados sobre as bases neuroquímicas e neuroinflamatórias da relação entre sono e o sistema imunológico.

## 7. CONCLUSÕES

- O protocolo de PSP aplicado em camundongos pelo método da plataforma múltipla foi eficaz em produzir supressão do sono paradoxal/REM e redução significativa do sono de ondas lentas/NREM.
- A PSP provocou diminuição seletiva de linfócitos na circulação e de seus subtipos no baço. No entanto, essas células não migraram para outros sítios imunológicos, haja vista que nenhuma diferença é encontrada nos linfonodos e no peritônio.
- A PSP afetou expressivamente a resposta comportamental ao LPS, aumentando a susceptibilidade a doses menores de LPS. Essas alterações provocadas pela PSP no comportamento foram diretamente relacionadas a mudanças na transmissão dopaminérgica e noradrenérgica.
- A administração de LPS em animais PSP provocou inibição da expressão do rebote de sono paradoxal/REM. Paralelamente, encontramos uma correlação positiva entre o aumento de sono de ondas lentas/NREM dos animais tratados com LPS com a expressão de COX-2 no córtex cerebral.
- Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que o sono exerce um papel fundamental na resposta fisiológica à desafios imunológicos através de mecanismos celulares, comportamentais e neuroquímicos.

## 8. REFERÊNCIAS

- Andersen ML, Bignotto M, Machado RB e Tufik S. Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res* 37: 791-7, 2004.
- Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M e Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res* 14: 83-90, 2005.
- Aserinsky E e Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118: 273-4, 1953.
- Beishuizen A e Thijs LG. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res* 9: 3-24, 2003.
- Biswas S, Mishra P e Mallick BN. Increased apoptosis in rat brain after rapid eye movement sleep loss. *Neuroscience* 142: 315-31, 2006.
- Blanke R, Meakin C, Millet S e Gardner CR. Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha. *Gen Pharmacol* 27: 973-7, 1996.
- Boyum A, Wiik P, Gustavsson E, Veiby OP, Reseland J, Haugen AH e Opstad PK. The effect of strenuous exercise, calorie deficiency and sleep deprivation on white blood cells, plasma immunoglobulins and cytokines. *Scand J Immunol* 43: 228-35, 1996.
- Bryant PA, Trinder J e Curtis N. Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system? *Nat Rev Immunol* 4: 457-67, 2004.
- Cohn DW e de Sa-Rocha LC. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. *Physiol Behav* 87: 932-7, 2006.

- Conceicao IM e Frussa-Filho R. Effects of microgram doses of haloperidol on open-field behavior in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 833-8, 1996.
- Cruz AP, Frei F e Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 171-6, 1994.
- Dahan L, Astier B, Vautrelle N, Urbain N, Kocsis B e Chouvet G. Prominent burst firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area during paradoxical sleep. *Neuropsychopharmacology* 32: 1232-41, 2007.
- Dement W e Kleitman N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 9: 673-90, 1957.
- Dinges DF, Douglas SD, Zaugg L, Campbell DE, McMann JM, Whitehouse WG, Orne EC, Kapoor SC, Icaza E e Orne MT. Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J Clin Invest* 93: 1930-9, 1994.
- Dunn AJ. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 261: 964-9, 1992a.
- Dunn AJ. The role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in the neurochemical and neuroendocrine responses to endotoxin. *Brain Res Bull* 29: 807-12, 1992b.
- Dunn AJ. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res* 6: 52-68, 2006.
- Dunn AJ e Swiergiel AH. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 688-93, 2005.

- Dunn AJ, Swiergiel AH, Zhang H e Quan N. Reduced ingestion of sweetened milk induced by interleukin-1 and lipopolysaccharide is associated with induction of cyclooxygenase-2 in brain endothelia. *Neuroimmunomodulation* 13: 96-104, 2006.
- Dunn AJ, Wang J e Ando T. Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv Exp Med Biol* 461: 117-27, 1999.
- Dzirasa K, Ribeiro S, Costa R, Santos LM, Lin SC, Grosmark A, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG e Nicolelis MA. Dopaminergic control of sleep-wake states. *J Neurosci* 26: 10577-89, 2006.
- Everson CA. Sustained sleep deprivation impairs host defense. *Am J Physiol* 265: R1148-54, 1993.
- Everson CA. Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1054-63, 2005.
- Everson CA, Thalacker CD e Hogg N. Phagocyte migration and cellular stress induced in liver, lung, and intestine during sleep loss and sleep recovery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R2067-74, 2008.
- Everson CA e Toth LA. Systemic bacterial invasion induced by sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R905-16, 2000.
- Gundersen Y, Opstad PK, Reistad T, Thrane I e Vaagenes P. Seven days' around the clock exhaustive physical exertion combined with energy depletion and sleep deprivation primes circulating leukocytes. *Eur J Appl Physiol* 97: 151-7, 2006.

- Irwin M, Mascovich A, Gillin JC, Willoughby R, Pike J e Smith TL. Partial sleep deprivation reduces natural killer cell activity in humans. *Psychosom Med* 56: 493-8, 1994.
- Irwin M, McClintick J, Costlow C, Fortner M, White J e Gillin JC. Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. *Faseb J* 10: 643-53, 1996.
- Jain NK, Kulkarni SK e Singh A. Lipopolysaccharide-mediated immobility in mice: reversal by cyclooxygenase enzyme inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 23: 441-4, 2001.
- Johnson PM, Vogt SK, Burney MW e Muglia LJ. COX-2 inhibition attenuates anorexia during systemic inflammation without impairing cytokine production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E650-6, 2002.
- Jouvet D, Vimont P, Delorme F e Jouvet M. [Study of Selective Deprivation of the Paradoxal Sleep Phase in the Cat.]. *C R Seances Soc Biol Fil* 158: 756-9, 1964.
- Kim Y, Laposky AD, Bergmann BM e Turek FW. Repeated sleep restriction in rats leads to homeostatic and allostatic responses during recovery sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10697-702, 2007.
- Kozak W, Conn CA e Kluger MJ. Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice. *Am J Physiol* 266: R125-35, 1994.
- Lacosta S, Merali Z e Anisman H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. *Brain Res* 818: 291-303, 1999.

- Lancel M, Cronlein J, Muller-Preuss P e Holsboer F. Lipopolysaccharide increases EEG delta activity within non-REM sleep and disrupts sleep continuity in rats. *Am J Physiol* 268: R1310-8, 1995.
- Lange T, Perras B, Fehm HL e Born J. Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination. *Psychosom Med* 65: 831-5, 2003.
- Lena I, Parrot S, Deschaux O, Muffat-Joly S, Sauvinet V, Renaud B, Suaud-Chagny MF e Gottesmann C. Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep-wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *J Neurosci Res* 81: 891-9, 2005.
- Lima MMS, Andersen ML, Reksidler AB, Silva A, Zager A, Zanata SM, Vital MA e Tufik S. Blockage of dopaminergic D(2) receptors produces decrease of REM but not of slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. *Behav Brain Res* 188: 406-11, 2008.
- Lima MMS, Andersen ML, Reksidler AB, Vital MA e Tufik S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS ONE* 2: e513, 2007.
- Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA e Tufik S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res* 1004: 45-51, 2004.
- Machado RB, Suchecki D e Tufik S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. *Behav Brain Res* 160: 356-64, 2005.
- Martins R, Andersen M, Garbuio S, Bittencourt L, Shih M, Hoexter M, Bressan R, Castiglioni M e Tufik S. Dopamine Transporter Regulation during Four

- Nights of REM Sleep Deprivation and Recovery – in vivo Molecular Imaging Study in Humans. Submetido, 2009.
- Morden B, Mitchell G e Dement W. Selective REM sleep deprivation and compensation phenomena in the rat. *Brain Res* 5: 339-49, 1967.
- Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S e Petre CO. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 1214-24, 2005.
- Mullington J, Korth C, Hermann DM, Orth A, Galanos C, Holsboer F e Pollmacher T. Dose-dependent effects of endotoxin on human sleep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R947-55, 2000.
- Nunes Junior GP, Tufik S e Nobrega JN. Autoradiographic analysis of D1 and D2 dopaminergic receptors in rat brain after paradoxical sleep deprivation. *Brain Res Bull* 34: 453-6, 1994.
- Ozturk L, Pelin Z, Karadeniz D, Kaynak H, Cakar L e Gozukirmizi E. Effects of 48 hours sleep deprivation on human immune profile. *Sleep Res Online* 2: 107-11, 1999.
- Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA e Gilliland MA. Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep* 12: 68-87, 1989.
- Rodgers RJ e Johnson NJ. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 297-303, 1995.
- Ruiz FS, Andersen ML, Zager A, Martins RC e Tufik S. Sleep deprivation reduces the lymphocyte count in a non-obese mouse model of type 1 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* 40: 633-7, 2007.

- Santos-Silva R, Tufik S, Conway SG, Taddei JA e Bittencourt LR. Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study: Rationale, design, sampling, and procedures. *Sleep Med*, 2009.
- Schiffelholz T e Lancel M. Sleep changes induced by lipopolysaccharide in the rat are influenced by age. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R398-403, 2001.
- Silva RH, Abilio VC, Takatsu AL, Kameda SR, Grassl C, Chehin AB, Medrano WA, Calzavara MB, Registro S, Andersen ML, Machado RB, Carvalho RC, Ribeiro Rde A, Tufik S e Frussa-Filho R. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology* 46: 895-903, 2004.
- SucHECKI D, Lobo LL, Hipolide DC e Tufik S. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res* 7: 276-81, 1998.
- SucHECKI D, Tiba PA e Tufik S. Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. *J Neuroendocrinol* 14: 549-54, 2002.
- SucHECKI D e Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav* 68: 309-16, 2000.
- Swiergiel AH e Dunn AJ. Distinct roles for cyclooxygenases 1 and 2 in interleukin-1-induced behavioral changes. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 1031-6, 2002.

- Swiergiel AH e Dunn AJ. Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. *Pharmacol Biochem Behav* 86: 651-9, 2007.
- Swiergiel AH, Smagin GN e Dunn AJ. Influenza virus infection of mice induces anorexia: comparison with endotoxin and interleukin-1 and the effects of indomethacin. *Pharmacol Biochem Behav* 57: 389-96, 1997.
- Takao T, Tracey DE, Mitchell WM e De Souza EB. Interleukin-1 receptors in mouse brain: characterization and neuronal localization. *Endocrinology* 127: 3070-8, 1990.
- Terao A, Matsumura H e Saito M. Interleukin-1 induces slow-wave sleep at the prostaglandin D2-sensitive sleep-promoting zone in the rat brain. *J Neurosci* 18: 6599-607, 1998.
- Terao A, Matsumura H, Yoneda H e Saito M. Enhancement of slow-wave sleep by tumor necrosis factor-alpha is mediated by cyclooxygenase-2 in rats. *Neuroreport* 9: 3791-6, 1998.
- Timo-laria C, Negrao N, Schmidek WR, Hoshino K, Lobato de Menezes CE e Leme da Rocha T. Phases and states of sleep in the rat. *Physiol Behav* 5: 1057-62, 1970.
- Tufik S, Lindsey CJ e Carlini EA. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology* 16: 98-105, 1978.
- Tufik S, Santos-Silva R, Taddei J e Bittencourt L. High Obstructive Sleep Apnea Syndrome prevalence: an accurate estimate of an occult disease. Submetido, 2009.

- Turnbull AV e Rivier C. Regulation of the HPA axis by cytokines. *Brain Behav Immun* 9: 253-75, 1995.
- Velazquez-Moctezuma J, Dominguez-Salazar E, Cortes-Barberena E, Najera-Medina O, Retana-Marquez S, Rodriguez-Aguilera E, Jimenez-Anguiano A, Cortes-Martinez L e Ortiz-Muniz R. Differential effects of rapid eye movement sleep deprivation and immobilization stress on blood lymphocyte subsets in rats. *Neuroimmunomodulation* 11: 261-7, 2004.
- Yirmiya R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res* 711: 163-74, 1996.
- Yoshida H, Kubota T e Krueger JM. A cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates spontaneous and TNF-alpha-induced non-rapid eye movement sleep in rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R99-109, 2003.
- Zager A, Andersen ML, Ruiz FS, Antunes IB e Tufik S. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R504-9, 2007.
- Zuckerman SH, Shellhaas J e Butler LD. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis: effects of endogenous and exogenous glucocorticoids and the role of the pituitary-adrenal axis. *Eur J Immunol* 19: 301-5, 1989.

# **ANEXO 1**



São Paulo, 22 de setembro de 2006  
**CEP 1297/06**

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) **ADRIANO ZAGER**  
Co-Investigadores: Monica Levy Andersen; Sergio Tufik (orientador)  
Disciplina/Departamento: Psicobiologia/Medicina e Biologia do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: AFIP.

### **PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL**

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Efeitos da privação de sono na imunidade de camundongos”**.

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Estudo experimental - categoria D.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Não se aplica.

**OBJETIVOS:** O objetivo do presente trabalho será investigar os efeitos da privação de sono e da restrição de sono na imunidade de camundongos saudáveis; quantificar a perda de sono provocada pelo método de plataforma múltipla bem como seus períodos de recuperação.

**RESUMO:** Serão utilizados no presente trabalho aproximadamente 250 camundongos da linhagem C57BL/6J provenientes do Bioterio do INFAR. Os animais serão submetidos à cirurgia para implantação de eletrodos. Ao final do procedimento cirúrgico, o diclofenaco sódico e pentabiótico serão administrados para prevenir processos inflamatórios. A recuperação pós cirúrgica será fixada em 14 dias. Após o registro basal de 48 horas os animais dos grupos experimentais serão submetidos à PS por 24 ou 96 horas ou à RS por 21 dias com seus padrões eletrocorticográficos registrados. Os animais do grupo controle terão também os seus padrões eletrocorticográficos registrados porém em gaiolas moradia. Ao final de 24 ou 96 horas de PS ou de 24 horas de RS os animais serão retirados das gaiolas de registro e colocados em gaiolas moradia sendo submetidos ao registro de padrão de sono por 48 horas (período de recuperação). Em um segundo experimento, será avaliado os efeitos da Privação de sono pelo método da plataforma múltipla nos parâmetros imunológicos. Através de análises quantitativas e qualitativas de células imunológicas. Os animais serão divididos em 7 grupos: controle, PS por 24 horas, Rebote da PS por 24 horas, PS por 96hs, Rebote da PS por 96 horas, RS por 21 dias e rebote da restrição de sono por 21 dias. Ao final de cada experimento os animais serão sacrificados por decaptação..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Estudo que pretende estabelecer uma associação entre a privação e a restrição de sono com a imunocompetência em seres humanos e animais..

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos todos os procedimentos que serão utilizados neste estudo.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** sem financiamento externo (FINANCIADO PELA AFIP).

**CRONOGRAMA:** 24 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** MESTRADO.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 17/09/2007 e 11/09/2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

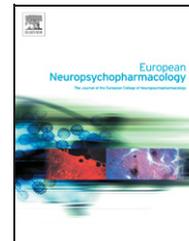
**Recomendação:** Caso novos experimentos sejam necessários para a consolidação da hipótese (como mencionado no projeto), lembramos a obrigatoriedade de envio destes para aprovação. Adequar o formulário ao projeto, com relação ao anestésico

# **ANEXO 2**



ELSEVIER

www.elsevier.com/locate/euroneuro



# Modulation of sickness behavior by sleep: The role of neurochemical and neuroinflammatory pathways in mice

Adriano Zager<sup>a</sup>, Monica L. Andersen<sup>a,\*</sup>, Marcelo M.S. Lima<sup>a</sup>,  
Angela B. Reksidler<sup>b</sup>, Ricardo B. Machado<sup>a</sup>, Sergio Tufik<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM), São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil

Received 22 January 2009; received in revised form 19 February 2009; accepted 24 March 2009

## KEYWORDS

Sickness behavior;  
Paradoxical sleep  
deprivation;  
Lipopolysaccharide;  
Locomotion;  
Dopamine;  
Cyclooxygenase-2

## Abstract

Activation of the immune system elicits several behavioral changes that are collectively called *sickness behavior* and consists in a strategy to overcome infection. Sleep deprivation can increase susceptibility to pathogens and to behavioral alterations. Thus, the present study aimed to determine how paradoxical sleep deprivation (PSD) affects the behavioral and neurochemical responses to lipopolysaccharide (LPS, potent activator of the immune response). Adult inbred mice were paradoxical sleep deprived (72 h), whereas the control group was kept in their home cages. Both groups received either an injection of saline or LPS (5, 10 or 20 µg/animal ip) before behavioral tasks and tissue collection. During the recovery sleep period, LPS provoked a strong inhibition of sleep rebound due to a suppression of paradoxical sleep. PSD increased the susceptibility of mice to LPS-induced immobility in the open field, which was capable of affecting the anxiety-like behavior also. These altered behavioral responses to LPS were accompanied by reduction in dopamine turnover within the striatum and increased expression of cyclooxygenase-2 in the cortex. The study provides some insights into how the sleep–wake cycle affects the expression of *sickness behavior* induced by LPS.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Sleep is thought to have powerful restorative properties and a deficit in the amount or quality of sleep is becoming increasingly prevalent in modern life and is widely believed to impair health. An extensive literature has documented the substantial behavioral effects in animal models of paradoxical sleep deprivation (PSD, also known as REM sleep

\* Corresponding author. Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, Rua Napoleão de Barros, 925, 04024-002 Vila Clementino, SP, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 2149 0155; fax: +55 11 5572 5092.

E-mail address: [mandersen@psicobio.epm.br](mailto:mandersen@psicobio.epm.br) (M.L. Andersen).

**Table 1** Paradoxical sleep deprivation changes the lipopolysaccharide response in the open field test.

Groups	Latency (s)	Central locomotion	Peripheral locomotion	Total locomotion	Rearing	Immobility time (s)
CTRL-Sal	6.4 ± 1.8	25.2 ± 3.2	44.7 ± 6.8	69.9 ± 9.4	24.5 ± 3.5	11.2 ± 2.0
PSD-Sal	3.9 ± 1.7	31.7 ± 2.8	43.6 ± 4.7	75.3 ± 6.7	22.3 ± 2.4	8.5 ± 2.1
CTRL-LPS 5 µg	9.3 ± 1.2	16.4 ± 1.5	28.1 ± 4.2	44.5 ± 4.6	12.2 ± 1.6 <sup>a</sup>	31.4 ± 4.7
PSD-LPS 5 µg	4.3 ± 0.7	12.3 ± 2.0 <sup>b</sup>	21.4 ± 3.7	33.7 ± 4.6 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.41 <sup>b</sup>	99.1 ± 13.4 <sup>b,c</sup>
CTRL-LPS 10 µg	4.5 ± 0.8	12.8 ± 2.1 <sup>a</sup>	27.7 ± 6.6	40.5 ± 8.4 <sup>a</sup>	7.6 ± 2.2 <sup>a</sup>	76.7 ± 12.4 <sup>a</sup>
PSD-LPS 10 µg	12.2 ± 6.9	11.5 ± 2.8 <sup>b</sup>	13.5 ± 5.5 <sup>b</sup>	17.6 ± 3.7 <sup>b</sup>	4.6 ± 1.8 <sup>b</sup>	82.6 ± 14.0 <sup>b</sup>
CTRL-LPS 20 µg	13.4 ± 2.4	6.6 ± 1.6 <sup>a</sup>	12.6 ± 3.7 <sup>a</sup>	19.2 ± 5.1 <sup>a</sup>	4.3 ± 2.8 <sup>a</sup>	145 ± 20.2 <sup>a</sup>
PSD-LPS 20 µg	80.2 ± 39.4 <sup>b,d,f,g</sup>	7.4 ± 3.3 <sup>b</sup>	9.3 ± 4.8 <sup>b</sup>	10.3 ± 5.3 <sup>b</sup>	3.7 ± 2.3 <sup>b</sup>	177.4 ± 21.1 <sup>b</sup>

Locomotor parameters in the open field of the home-cage control (CTRL) and paradoxical sleep deprived (PSD) groups treated with saline or lipopolysaccharide (LPS). The values are expressed as mean ± SEM ( $n=10$ /group).

<sup>a</sup> different from the CTRL-Sal group.

<sup>b</sup> different from the PSD-Sal group.

<sup>c</sup> different from the CTRL-LPS 5 µg group.

<sup>d</sup> different from the PSD-LPS 5 µg group.

<sup>e</sup> different from the PSD-LPS 10 µg group.

<sup>f</sup> different from the CTRL-LPS 20 µg group.

deprivation). These effects include increases in locomotor activity (Frussa-Filho et al., 2004), genital reflexes (Andersen and Tufik, 2006), stereotyped and aggressive behavior (Tufik et al., 1978), as well as a decrease in anxiety-like behavior (Suchecki et al., 2002). These behavioral changes are attributed to changes in several neurotransmitter pathways, including dopaminergic and noradrenergic neurotransmission (Tufik et al., 1978; Nunes Junior et al., 1994; Hipolide et al., 1998; Andersen et al., 2005a).

Although progress has been made in understanding the neurobiological basis of the effects of sleep deprivation, further studies are needed at the behavioral and neurochemical levels in order to examine the interaction between sleep deprivation and immune challenge, a well known consequence of sleep loss (Everson, 1993; Everson and Toth, 2000). The notion that sleep affects immune responses is supported by the association between short sleep duration and impaired immunization response (Spiegel et al., 2002; Lange et al., 2003), overall host defense (Irwin et al., 1994; Irwin et al., 1996) and general health (Wingard and Berkman, 1983; Kripke et al., 2002; Bass and Turek, 2005; Zee and Turek, 2006). In animals, the conception that sleep loss makes organisms more susceptible to pathogens is often reported in

prolonged total sleep deprivation studies (Everson and Toth, 2000; Everson, 2005), but also when the PSD method is adopted (Ruiz et al., 2007; Zager et al., 2007).

During infection involving Gram-negative bacteria, lipopolysaccharide (LPS) is released. LPS is the smallest immunogenic component of the outer cell wall, and it has been studied extensively in models of acute sepsis. This endotoxin not only acts as a nonspecific activator of the immune system by influencing cytokine secretion from macrophages, but it also influences neuroendocrine function and central neurotransmitter activity (Zuckerman et al., 1989; Dantzer et al., 2008; Teeling and Perry, 2008). LPS-induced activation of the immune system leads to several behavioral changes collectively termed *sickness behavior*. Symptoms of this condition include increases in anxiety-like (Lacosta et al., 1999) and depression-like behaviors (Yirmiya, 1996; Dunn et al., 2005), increase in slow wave sleep (SWS) (Lancel et al., 1995; Opp and Toth, 1998; Mullington et al., 2000; Toth and Opp, 2001; Morrow and Opp, 2005), changes in body temperature (Kozak et al., 1994; Blanque et al., 1996), and decreased locomotor activity (Kozak et al., 1994; Swiergiel and Dunn, 2007), social interaction (Cohn and de Sa-Rocha, 2006), and consumption of water and food (Swiergiel et al., 1997; Dunn et al., 2006).

**Table 2** Both paradoxical sleep deprivation and lipopolysaccharide alter overall striatal neurotransmission.

Groups	Norepinephrine	Dopamine	DOPAC	HVA	HVA/DA	5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-HT
CTRL-Sal	2.8 ± 0.1	14.6 ± 2.3	46.7 ± 3.1	15.9 ± 1.0	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1	4.1 ± 0.3	5.1 ± 0.8
PSD-Sal	4.0 ± 0.3	27.4 ± 3.1	30.4 ± 1.8 <sup>a</sup>	12.1 ± 0.5	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.5
CTRL-LPS 5 µg	4.2 ± 0.3	32.5 ± 3.0	25.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	11.8 ± 0.7	0.4 ± 0 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.3	5.4 ± 0.4	2.9 ± 0.4 <sup>a</sup>
PSD-LPS 5 µg	5.4 ± 0.4	47.7 ± 2.7	27.4 ± 2.9	13.3 ± 0.8	0.3 ± 0	2.8 ± 0.5	6.2 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.8 ± 0.5
CTRL-LPS 10 µg	3.7 ± 0.1	36.0 ± 3.4	16.9 ± 1.8 <sup>a</sup>	9.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.3 ± 0 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.4	5.5 ± 0.6	2.3 ± 0.3 <sup>a</sup>
PSD-LPS 10 µg	5.5 ± 0.7 <sup>e</sup>	64.0 ± 9.1 <sup>b,e</sup>	16.2 ± 1.9 <sup>b</sup>	10.6 ± 1.6	0.2 ± 0	4.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	5.6 ± 0.6	1.5 ± 0.1 <sup>b</sup>
CTRL-LPS 20 µg	5.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	69.1 ± 11.3 <sup>a</sup>	16.2 ± 2.2 <sup>a</sup>	10.6 ± 1.6 <sup>a</sup>	0.2 ± 0 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
PSD-LPS 20 µg	5.4 ± 0.3	97.4 ± 4.4 <sup>b,g</sup>	17.2 ± 2.2 <sup>b</sup>	10.9 ± 0.5	0.1 ± 0 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	6.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>b</sup>

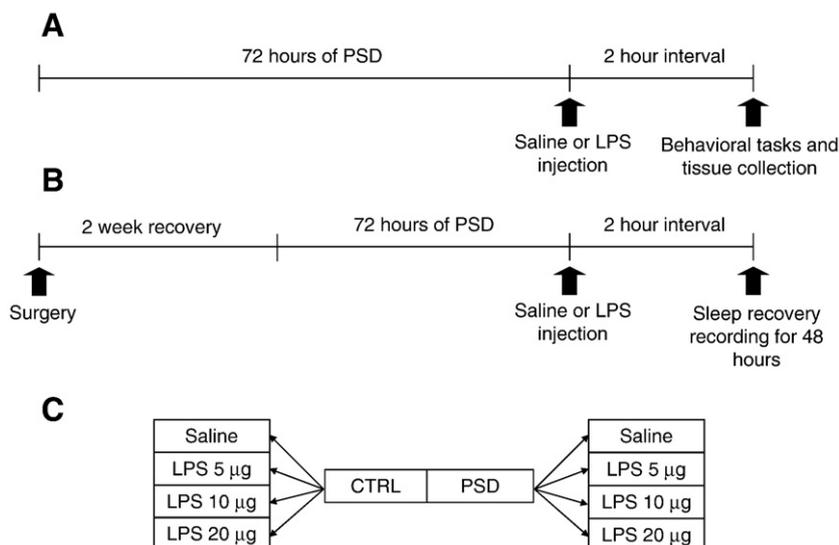
Mean values (±SEM) of striatal concentrations of neurotransmitters, their metabolites, and the turnover ratio ( $n=10$ /group).

<sup>a</sup> different from the CTRL-Sal group.

<sup>b</sup> different from the PSD-Sal group.

<sup>e</sup> different from the CTRL-LPS 10 µg group.

<sup>g</sup> different from the CTRL-LPS 20 µg group.



**Figure 1** Schematic representation of the experimental design. A time-line illustration of the sequence of events throughout the experiments shows the animals designated for behavioral tests and for blood and tissue collection (Panel A,  $n=10$ /group), as well as the animals subjected to sleep recovery recording (Panel B,  $n=5$ /group). Panel C illustrates the subdivisions of home-cage control (CTRL) and paradoxical sleep deprived (PSD) groups treated with saline or lipopolysaccharide (LPS).

These behavioral responses are triggered, most likely, by several alterations in neurotransmitter activity that are provoked by the actions of some cytokines (mainly IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ) and by expression of cyclooxygenase (COX) in the central nervous system (CNS) (Dunn, 1992; Dunn and Chuluyan, 1992; Dunn et al., 1999; Dunn, 2006; Harden et al., 2008). During the inflammatory response, COX-2 catalyzes prostaglandin synthesis in the CNS and modulates several behavioral changes (Terao et al., 1998b; Jain et al., 2001; Lima et al., 2006). It is important to stress that *sickness behavior* results not from physical weakening, but from an orchestrated biological response intended to overcome infection (Hart, 1988, 1990).

An important rationale in the investigation of *sickness behavior* is that it may change in intensity or magnitude when associated with disorganization of sleep–wake cycle. In order to delineate such assumption, we hypothesized that *sickness behavior* is modulated by sleep with an important participation of neurochemical and neuroinflammatory inputs. Nevertheless, both these manipulations can change central neurotransmission and overall behavior and can possibly influence each other. Thus, the present study sought to determine whether PSD affects the response of mice to immune challenge with LPS. Specifically, we examined the effects of PSD on LPS-induced changes in locomotor activity, anxiety-like behavior, and the sleep–wake cycle. To understand these processes within the CNS, we also studied changes in striatal neurotransmission and COX-2 expression in the brain.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Animals

Adult male C57BL/6J mice were bred and raised in the animal facility of the Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR, São Paulo, Brazil). Mice were approximately 90 days old and

weighing 25–30 g at the beginning of the experiment. The animals were housed in standard polypropylene cages in a colony maintained at 22 °C with a 12:12 h light–dark cycle (lights on at 0700 h), and they had free access to food and water. Mice used in this study were maintained and treated in accordance with the guidelines established by the Ethical and Practical Principles of the Use of Laboratory Animals (Andersen et al., 2004). This study was approved by the University's Ethical Committee for animal experimentation (#1297/06).

### 2.2. Paradoxical sleep deprivation (PSD)

Experimental groups were subjected to PSD for 72 h using the modified multiple platform method. In this method, five mice are placed inside cages (38 × 31 × 17 cm) containing 12 circular platforms (3.5 cm in diameter) with water up to 1 cm of their upper surface. At the onset of each paradoxical sleep episode, the animal experiences a loss of muscle tonus and falls into the water, thus awakening. During these experiments, food and water were available *ad libitum* and the water in the cage was changed daily throughout the PSD period. For control method, the animals were kept in their home cages, given that other types of controls of PSD (e.g. large platform) also compromise the regular sleep pattern (Machado et al., 2004). In order to quantify the sleep loss induced by the platform method in mice, another set of animals ( $n=8$ ) were simultaneously submitted to PSD and sleep recording.

### 2.3. Drugs

LPS derived from *Escherichia coli* serotype O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO, USA) was freshly dissolved in 0.9% sterile saline at the doses of 5, 10 or 20 µg/animal. The vehicle was also 0.9% sterile saline. All mice were injected intraperitoneally (i.p.) in a final volume of 0.2 ml.

The choice of these doses of LPS was based on a pilot study and previous data from the literature showing the dose-dependent effect of LPS on behavior and neurochemistry, mostly in its higher doses (Lacosta et al., 1999; Morrow and Opp, 2005; Abraham and Johnson, 2009). Furthermore, it is important to stress that the doses used here are far lower from the ones adopted to induce

inflammation and septic shock by other studies (Renault et al., 2008).

#### 2.4. Experimental procedure

After PSD period, mice residing in the water cages (PSD;  $n=10$ ) or home cages (CTRL;  $n=10$ ), received either an injection of saline or LPS. After the injection, mice were returned to their respective water cages (PSD groups) or home cages (control groups) for 2 h prior to behavioral testing (Fig. 1A). This interval between injection and testing was chosen because plasma levels of adrenocorticotropin and corticosterone (Takao et al., 1990; Yirmiya, 1996), as well as LPS-induced changes in behavior (Kozak et al., 1994), are at or near their maximum. All experiments were performed between 0900 h and 1200 h.

#### 2.5. Open field test

Each mouse was placed in the center of a circular arena (40 cm in diameter) divided into 19 squares and surrounded by a wall 40 cm high. Animals were observed for 5 min. Frequency of peripheral locomotion (in the 12 squares close to the wall), central locomotion (in the seven divisions not contiguous with the wall), and total locomotion was quantified by counting the number of inter-square lines crossed. An entry into a square was counted once the mouse had entered a new square with all four paws. The latency time for the first movement, immobility time during the trial, and rearing frequency were also measured.

#### 2.6. Elevated plus-maze test

The plus-maze consisted of two open arms (28.5×7 cm) and two closed arms (28.5×7×14 cm) arranged perpendicularly. The maze was elevated 50 cm above the floor. Each mouse was placed in the center of the apparatus and the number of entries and time spent in open and closed arms were recorded for 5 min. Percent time spent in the open arms was calculated by the formula:  $[\text{time in open arms} / (\text{time in open arms} + \text{time in closed arms})] \times 100$ .

#### 2.7. Blood collection and brain dissection

Immediately after the behavioral tests, animals were decapitated in an adjacent room and had their brains dissected. An aliquot of blood was placed in vacuum tubes and centrifuged at 4 °C at 1500 g for 15 min. The plasma was frozen at -80 °C until analysis. The isolation and collection of brain samples was performed using traditional manual micro-dissection methods as applied to several neurochemical studies. During the procedure we utilized information from Paxinos and Franklin (2001) for guidance. In addition, all isolated tissue of every animal was weighed, ensuring homogeneity. By adopting these procedures we believed we have reached a high standard control without contamination of other brain areas. The cortex, hypothalamus, and striatum were dissected and stored at -80 °C until analysis.

#### 2.8. Implantation of electrodes and recording during sleep recovery

Different groups were run simultaneously for recording of electrocorticographic (ECoG) and electromyographic (EMG) activities, thus permitting assessment of the sleep-wake cycle during PSD and recovery. Anesthesia was induced by i.p. administration of ketamine-xylazine. Two pairs of electrodes (steel screws) were implanted in the fronto-parietal medial derivation (One pair on each side of the skull) for ECoG recording. One additional pair of nickel-chrome electrodes was also implanted in the dorsal muscle of

the mouse's neck for EMG recording. The electrodes were soldered to a connector, which was fixed to the animal cranium with acrylic dental cement. After surgery, mice were given pentabiotic and diclofenac, and mice were allowed to recover from surgery for two weeks. After the recovery period, mice ( $n=5/\text{group}$ ) were subjected to the PSD (PSD group) or placed in their home cages (control group) for 72 h. On the day of the experiment, the animals received an injection of saline or one of three doses of LPS and they were returned to their respective location (e.g. home cage or water cage) for 2 h before sleep recording (Fig. 1B). The animals were subjected to undisturbed sleep recording for 48 h using the Somnologica software (EMBLA Medical digital polygraph, Reykjavik, Iceland). The sleep pattern was visually and manually scored by a single blinded researcher, thus ensuring consistency of the data. The following sleep parameters were considered: total sleep time (percentage of sleep time during the recording), total SWS (percentage of all periods of deep sleep during the recording), and total paradoxical sleep (percentage of all periods of paradoxical during the recording). SWS was classified by EEG voltage of 20–30  $\mu\text{V}$  (usually 200–400  $\mu\text{V}$ , peak to peak) and low frequency activity (delta waves, 1–4 Hz). Paradoxical sleep presented EEG voltage below 20  $\mu\text{V}$  with high and regular theta activity (6–10 Hz), especially in the fronto-parietal medial EEG derivation, and muscle atonia in EMG recording. In addition, during the sleep recovery period, the mortality rate of animals was followed.

#### 2.9. Corticosterone assay

Plasma corticosterone levels were assayed by a commercial double antibody radioimmunoassay method specifically designed for rats and mice (MP Biomedicals, USA). The sensitivity of the assay was 0.25 ng/ml.

#### 2.10. Striatal monoamine concentrations

Striatum samples were weighed individually and homogenized by sonication in 500  $\mu\text{L}$  of extraction solution (0.1 M perchloric acid containing 0.4 mM sodium metabisulfite and 0.2 mM EDTA). The homogenates were centrifuged at 20,000 g for 10 min, then filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane and stored at -80 °C until analysis. Precipitates were dissolved in 0.1 N NaOH and assayed for protein estimation (Bicinchoninic acid method, Pierce Chemical, USA).

Supernatants were subjected to fast isocratic separation through a C18 High performance liquid chromatography (HPLC) reverse-phase column system (Spheri-5, C18, ODS, 5  $\mu\text{m}$ , 25 cm×4.6 mm column; linked to a NewGuard Cartridge Column, RP-18, 7  $\mu\text{m}$  pre-column; PerkinElmer Brownlee Columns, USA) and electrochemically detected using an amperometric detector (L-ECD-6A, Shimadzu, Japan) by oxidation on a glass carbon electrode at +850 mV relative to an Ag-AgCl reference electrode. The mobile phase consisted of the following components diluted in double-distilled water: 0.163 M citric acid, 0.06 M sodium phosphate (dibasic anhydrous), 0.69 mM octyl sodium sulfate, 12 mM EDTA, 4% acetonitrile, 1.7% tetrahydrofuran, and sufficient orthophosphoric acid to bring the pH to 2.85. The mobile phase was filtered through a 0.2- $\mu\text{m}$  membrane, degassed under helium, and delivered at a flow rate of 1.4 ml/min. Each sample was analyzed in duplicate for concentrations of norepinephrine (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT), and their non-conjugated metabolites such as 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA). Analyte recovery was determined by adding a fixed concentration of dihydroxybenzylamine (DHBA) as an internal standard prior to tissue homogenization (Machado et al., 2008). All standards and salts were purchased from Sigma (St. Louis, USA) and the solvents (HPLC grade) were purchased from Carlo Erba (Italy).

### 2.11. Determination of COX-2 protein expression

Cortex and hypothalamus were lysed in 1.5-ml Eppendorf tubes by sonication in the presence of an ice-cold buffer containing 50 mM Tris (pH 8.0), 250 mM NaCl, 1% nonyl-phenoxypolyethoxyethanol (NP-40), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.25% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 20  $\mu$ M phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), and other protease inhibitors (Complete tablet; Roche, USA).

After incubation on ice for 30 min, extracts were centrifuged at 12,000 g for 40 min at 4 °C, and the supernatants were collected and stored at -80 °C for later Western blot analysis. The aliquot of supernatant was collected for total protein analysis. Samples containing equal amounts of total protein (40  $\mu$ g/lane) were boiled with SDS sample buffer and electrophoresed on a 10% SDS-polyacrylamide gel in a Mini VE System (General Electric, USA). Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes using a Mini Transblot Electrophoretic Transfer Cell (General Electric, USA). Each membrane was blocked for 1 h in nonfat dry milk/0.5% Tween-20 in Tris-buffered saline. Subsequently, each membrane was probed overnight at 4 °C with monoclonal antibodies against COX-2 (1:400; Calbiochem, USA) or  $\beta$ -tubulin (1:500; Chemicon, USA), followed by several washes in TBST. The membranes were then incubated with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:5000) for 60 min, and visualized by chemiluminescence (ECL; Amersham, USA). Bands were quantified using the software ImageJ.

### 2.12. Statistical analysis

For analysis of the behavioral tests, monoamine and corticosterone concentrations, two-way analysis of variance (ANOVA) were performed, with group and treatment as main factors. For sleep recordings during the recovery period, repeated measures ANOVA was applied, with group and time as main factors. COX-2 expression in cortex and hypothalamus was analyzed by one-way ANOVA. When appropriate, post-hoc analyses were performed using the Tukey's test following ANOVA.

A Pearson correlation coefficient was calculated to compare COX-2 expression in the cortex with amount of SWS during the first day of recovery sleep. For the recordings made during PSD, a *t*-test for dependent samples was applied for comparison between day 0 (baseline) and days 1, 2 and 3 (PSD period).

Kaplan–Meier analysis was used for mortality rate of animals during the sleep recovery recording. Mice that did not die until the end of the recording were considered censored data. Proportion and survival curves were compared using the log rank test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. The level of statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

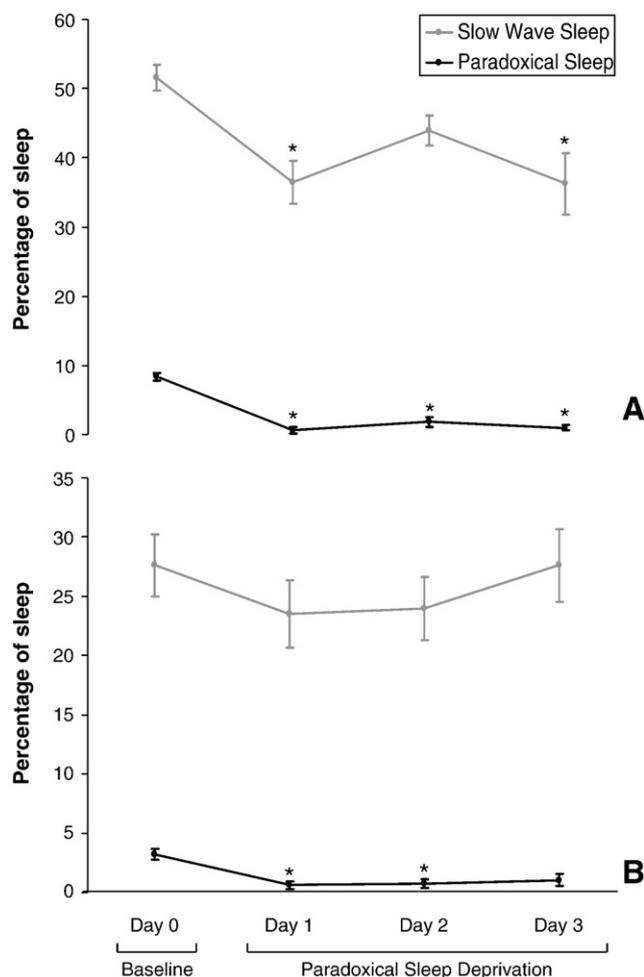
### 3.1. Sleep deprivation recording

PSD significantly reduced the time spent in SWS on days 1 ( $p < 0.01$ ) and 3 ( $p < 0.05$ ) compared to the baseline during the light period (Fig. 2A), although no differences were found in SWS time in the dark period.

In contrast to SWS, paradoxical sleep was strongly reduced below baseline for all days of PSD during the light period: day 1 ( $p < 0.001$ ), day 2 ( $p < 0.01$ ), and day 3 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 2A). During the dark period, paradoxical sleep was affected only on day 1 ( $p < 0.01$ ) and day 2 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2B).

### 3.2. Open field behavioral test

ANOVA showed that changes in total locomotion were effects of both group [ $F(1,70) = 4.15$ ;  $p < 0.05$ ] and treatment [ $F(3,70) =$



**Figure 2** Effect of paradoxical sleep deprivation on the sleep pattern of mice. Mean values ( $\pm$ SEM) of the percentage of sleep during the light period (Panel A) and the dark period (Panel B) during 72 h of paradoxical sleep deprivation using the multiple platform method in mice ( $n = 8$ ). \* different from baseline levels.

29.26;  $p < 0.001$ ]. Groups receiving LPS showed significantly less locomotion than groups receiving saline (Fig. 3A). In control groups, LPS doses of 10  $\mu$ g ( $p < 0.05$ ) and 20  $\mu$ g ( $p < 0.001$ ) reduced locomotion frequency below the level seen in the saline group. In the PSD groups, however, all LPS doses (5, 10, and 20  $\mu$ g) reduced locomotion frequency ( $p < 0.001$ ) (Table 1).

### 3.3. Elevated plus-maze test

As can be seen in Fig. 3B, PSD increased the number of open arm entries to a level higher than in the corresponding control group ( $p < 0.01$ ), as indicated by ANOVA tests of group [ $F(1,72) = 9.89$ ;  $p < 0.01$ ], treatment [ $F(3,72) = 5.22$ ;  $p < 0.01$ ], and interaction [ $F(3,72) = 2.71$ ;  $p < 0.05$ ] effects. Moreover, treating PSD animals with LPS reduced the number of entries at all doses tested: 5  $\mu$ g ( $p < 0.05$ ), 10  $\mu$ g ( $p < 0.01$ ), and 20  $\mu$ g ( $p < 0.05$ ).

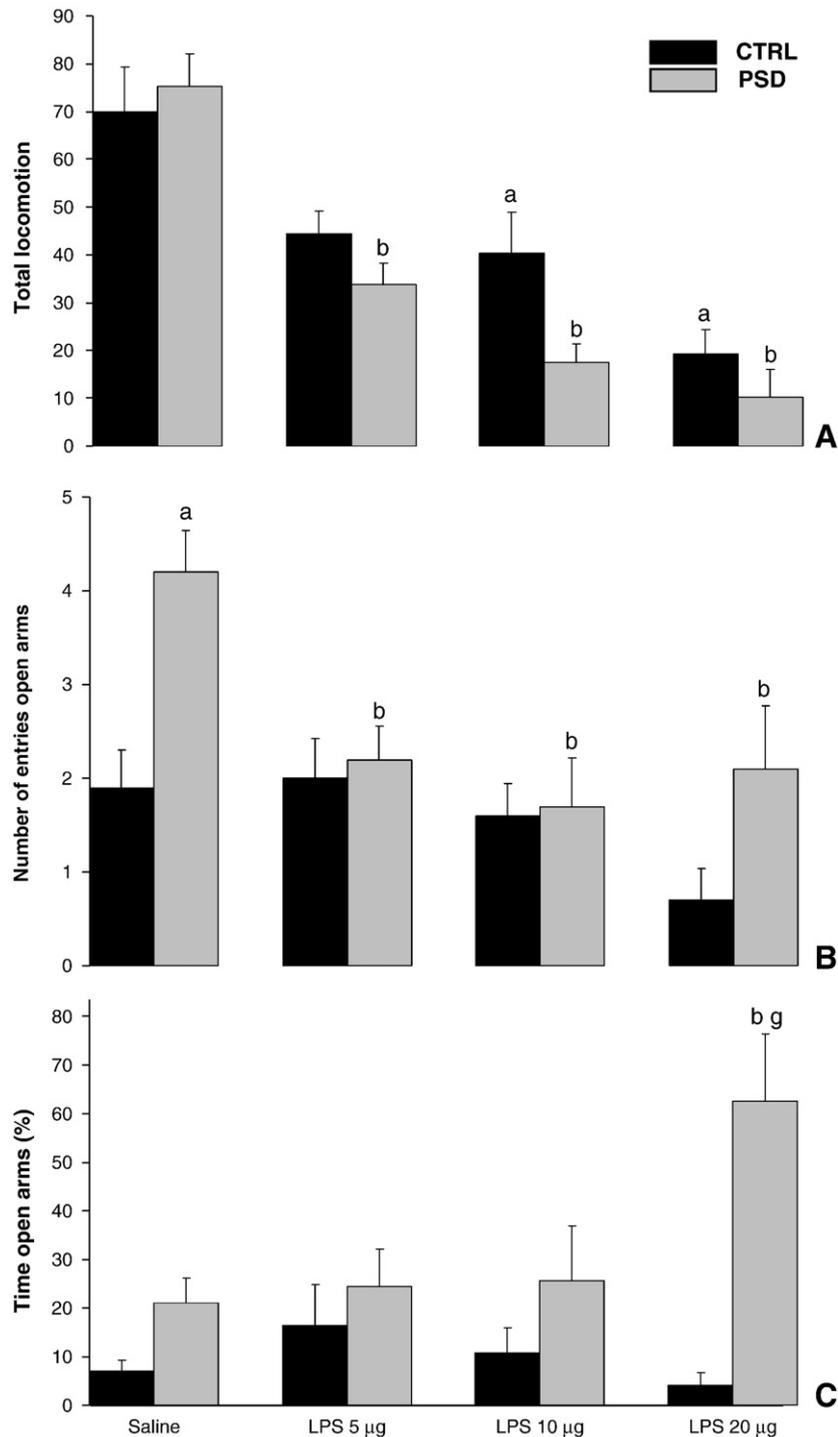
Injection of LPS 20  $\mu$ g in PSD mice significantly increased the percentage of time that they spent in the open arms compared to the corresponding control group ( $p < 0.001$ ) and to the PSD-Sal group ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3C). This difference was attributed to group [ $F(1,71) = 18.15$ ;  $p < 0.001$ ] and interaction [ $F(3,71) = 4.18$ ;  $p < 0.01$ ] effects.

### 3.4. Sleep recovery recording

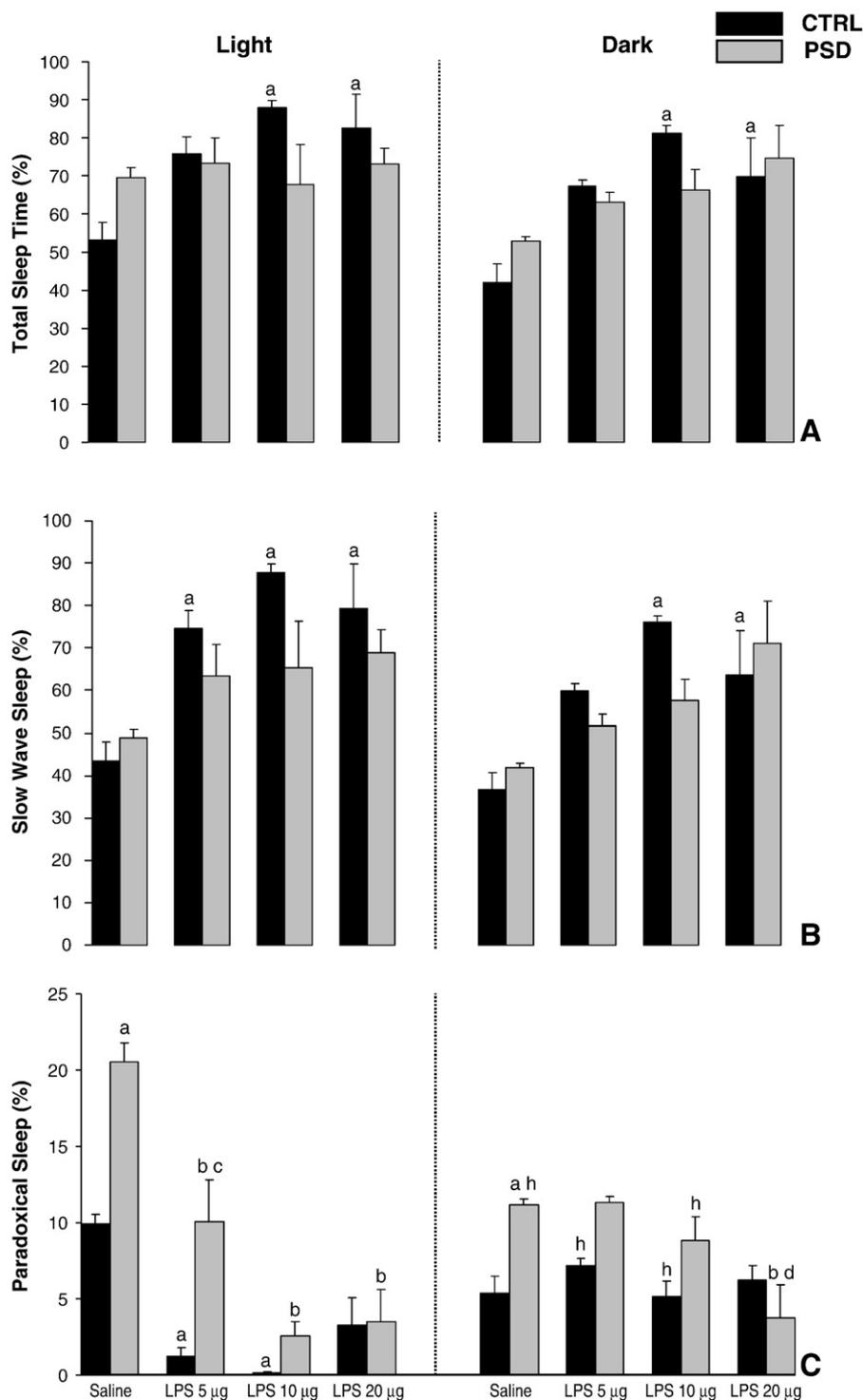
#### 3.4.1. Total sleep time

ANOVA revealed a significant group [ $F(7,26)=4.81$ ;  $p<0.001$ ] and time effects [ $F(1,26)=23.55$ ;  $p<0.001$ ] during the light period (Fig. 4A). Treating the control group with LPS doses of

10  $\mu\text{g}$  ( $p<0.001$ ) and 20  $\mu\text{g}$  ( $p<0.001$ ) significantly increased sleep on day 1. Moreover, these changes persisted during the dark period, and the CTRL-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p<0.001$ ) and CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  ( $p<0.01$ ) groups showed greater sleep time than baseline on day 1. The levels in all groups returned to baseline on day 2, except for the differences between the PSD-Sal and PSD-20 LPS



**Figure 3** Paradoxical sleep deprivation alters lipopolysaccharide-induced sickness behavior. Mean values ( $\pm$ SEM) of the frequency of total locomotion of mice in the open field (Panel A) and anxiety-like behavior measured by the number of entries in open arms (Panel B) and the time spent in open arms (Panel C) of the elevated plus-maze ( $n=10/\text{group}$ ). <sup>a</sup> different from CTRL-Sal group, <sup>b</sup> different from the PSD-Sal group, <sup>g</sup> different from the CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  group.



**Figure 4** Sleep alterations provoked by lipopolysaccharide can suppress paradoxical sleep rebound after paradoxical sleep deprivation. Percentage of total sleep time (Panel A), slow wave sleep (panel B), and paradoxical sleep (Panel C) during the recovery period of paradoxical sleep deprived animals that received lipopolysaccharide (LPS). The values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ /group). <sup>a</sup> different from the CTRL-Sal group, <sup>b</sup> different from the PSD-Sal group, <sup>c</sup> different from the CTRL-LPS 5  $\mu$ g, <sup>d</sup> different from the PSD-LPS 5  $\mu$ g, <sup>h</sup> different from the respective light phase.

$\mu$ g groups ( $p<0.01$ ). ANOVA indicated significant effects of group [ $F(7,25)=9.12$ ;  $p<0.001$ ] and time [ $F(1,25)=24.45$ ;  $p<0.001$ ] during the dark period. No significant alterations were found between the light and the dark phase of day 1 in the total sleep time ( $p>0.05$ ).

#### 3.4.2. Slow wave sleep time

Regarding the time spent in SWS during the light period, ANOVA showed significant group [ $F(7,26)=7.25$ ;  $p<0.001$ ], time [ $F(1,26)=23.53$ ;  $p<0.001$ ], and interaction effects [ $F(7,26)=2.37$ ;  $p<0.05$ ]. All LPS doses increased SWS time on day 1 of

the control groups: 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.01$ ), 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.0001$ ), and 20  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.01$ ). During the dark period, ANOVA revealed significant differences between groups [ $F(7,25) = 9.79$ ;  $p < 0.001$ ] and time effects [ $F(1,25) = 17.53$ ;  $p < 0.001$ ]. The CTRL groups had longer SWS on day 1 with LPS doses of 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.001$ ) and 20  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ), compared to saline group. On day 2, the PSD-Sal and PSD-LPS 20  $\mu\text{g}$  groups showed significant differences ( $p < 0.01$ ) (Fig. 4B). All of the other changes in duration of SWS had reverted back to baseline by day 2. No significant alterations were found between the light and the dark phase of day 1 in the slow wave sleep time ( $p > 0.05$ ).

### 3.4.3. Paradoxical sleep time

Analysis of the time of paradoxical sleep during the light period showed significant group effects [ $F(7,26) = 13.81$ ;  $p < 0.001$ ] and group  $\times$  time interaction [ $F(7,26) = 13.85$ ;  $p < 0.001$ ]. LPS injection significantly reduced the paradoxical sleep time to below the level of the CTRL-Sal group on day 1 in the groups CTRL-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.01$ ) and CTRL-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.001$ ). When the animals had a recovery period after PSD, the group PSD-Sal showed an increase in paradoxical sleep of 107% on day 1 ( $p < 0.001$ ). On day 2, all groups returned to baseline values ( $p < 0.001$ ). In contrast, animals receiving LPS after PSD showed less paradoxical sleep than the saline group on day 1. This effect was observed at all LPS doses ( $p < 0.001$  in all cases), as depicted in Fig. 4C.

ANOVA followed by a post-hoc Tukey test revealed significant group effects [ $F(7,25) = 3.12$ ;  $p < 0.001$ ] during the dark period. On day 1, the PSD-Sal group had higher values than the CTRL-Sal group ( $p < 0.01$ ). Moreover, the reduction in duration of paradoxical sleep on day 1 persisted in the PSD-LPS 20  $\mu\text{g}$  group, which had less paradoxical sleep than the PSD-Sal ( $p < 0.01$ ) and PSD-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ) groups. Comparison between the light and the dark phase of day 1 indicates a significant group [ $F(7,26) = 13.440$ ;  $p < 0.001$ ] and interaction [ $F(7,26) = 14.905$ ;  $p < 0.001$ ] effect. The pos-hoc test demonstrates a reduction of paradoxical sleep in the group PSD-Sal ( $p < 0.001$ ), and a significant increase in the groups

CTRL-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.01$ ), CTRL-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ) and PSD-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ) at the dark phase (Fig. 4C).

### 3.4.4. Mortality rate

The Kaplan–Meier test showed no statistical differences among the distinct experimental groups on the mortality rate during the sleep recovery ( $p > 0.05$ ).

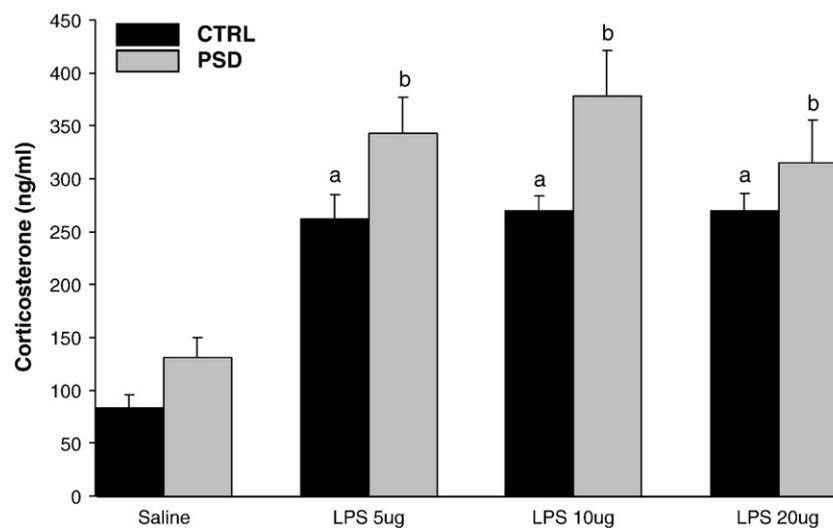
### 3.4.5. Corticosterone

ANOVA showed both group [ $F(1,66) = 5.77$ ;  $p < 0.01$ ] and treatment [ $F(3,66) = 17.93$ ;  $p < 0.001$ ] effects for corticosterone concentration (Fig. 5). However, only the groups receiving LPS showed statistically significant differences from controls in the Tukey test. The groups CTRL-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.01$ ), CTRL-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.01$ ), and CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.01$ ) showed differences from the CTRL-Sal group; the groups PSD-LPS 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.001$ ), PSD-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.001$ ), and PSD-LPS 20  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ) showed differences from the PSD-Sal group.

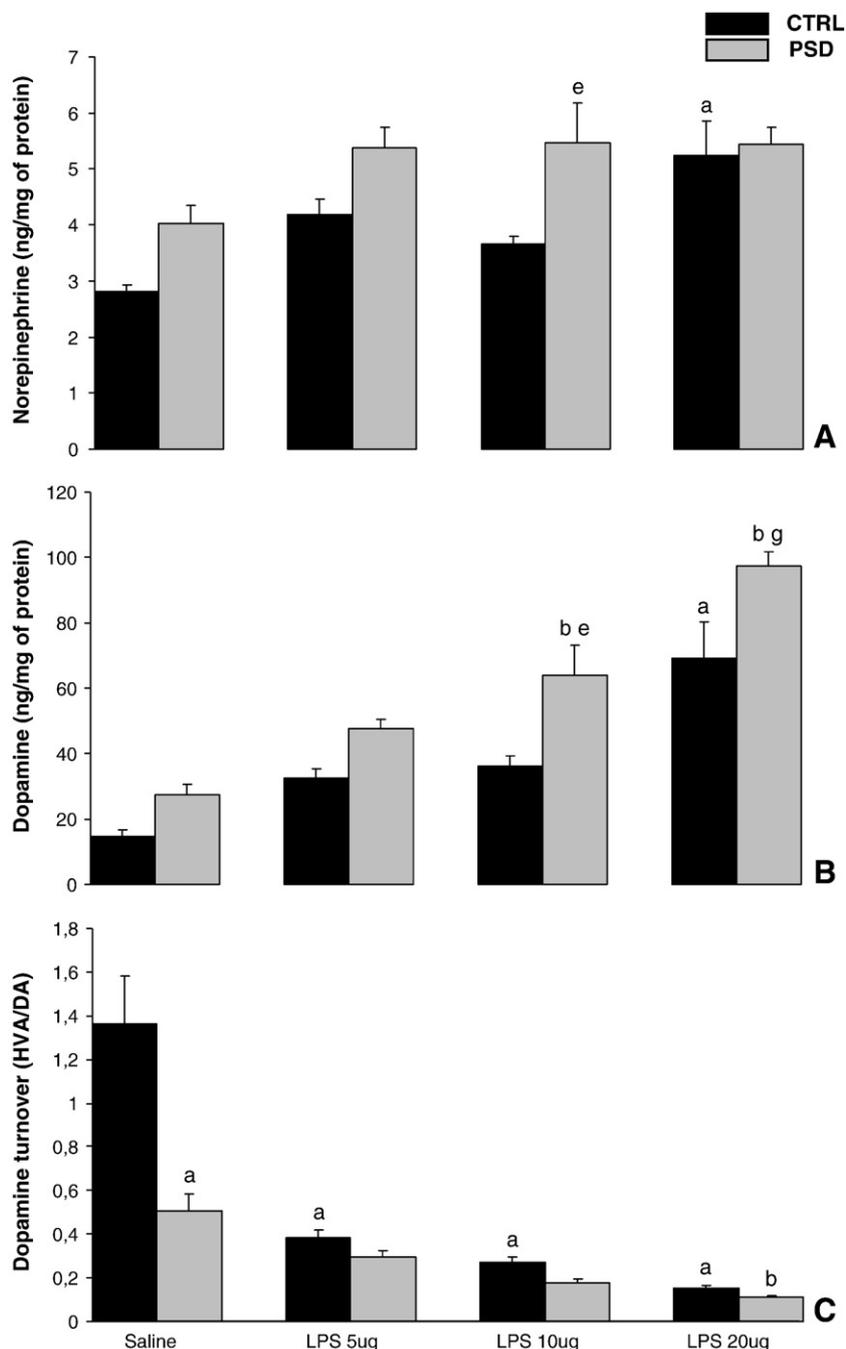
### 3.4.6. Monoamine concentrations

Norepinephrine (NE) was significantly affected by PSD and LPS treatment, as indicated by group [ $F(1,70) = 15.44$ ;  $p < 0.001$ ] and treatment [ $F(3,70) = 8.37$ ;  $p < 0.001$ ] effects. The CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  group showed higher NE levels than the CTRL-Sal group ( $p < 0.001$ ). In addition, the NE level of the PSD-LPS 10  $\mu\text{g}$  group was higher than that of the CTRL-LPS 10  $\mu\text{g}$  group ( $p < 0.05$ ), as shown by Tukey post-hoc test (Fig. 6A).

ANOVA revealed a significant group [ $F(1,70) = 26.503$ ;  $p < 0.001$ ] and treatment [ $F(3,70) = 41.63$ ;  $p < 0.001$ ] effects on dopamine (DA) concentration. The Tukey test showed that the DA concentration was higher in the CTRL-LPS 20  $\mu\text{g}$  group than in the CTRL-Sal group ( $p < 0.001$ ), and that the concentration was higher in the PSD-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.001$ ) and PSD-LPS 20  $\mu\text{g}$  groups ( $p < 0.001$ ) than in the PSD-Sal group. Both the PSD-LPS 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ) and PSD-LPS 20  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.01$ ) groups showed higher concentrations of DA than their respective controls (Fig. 6B).



**Figure 5** Activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis induced by lipopolysaccharide. Mean values ( $\pm$ SEM) of plasma corticosterone concentration in mice paradoxical sleep deprived and/or injected with lipopolysaccharide ( $n = 10/\text{group}$ ). <sup>a</sup> different from CTRL-Sal group, <sup>b</sup> different from PSD-Sal group.



**Figure 6** Sleep deprivation alters neurochemical response to lipopolysaccharide. Mean values ( $\pm$ SEM) of striatal norepinephrine (Panel A), dopamine (Panel B), and HVA/DA ratio (Panel C) ( $n=10$ /group). <sup>a</sup> different from the CTRL-Sal group, <sup>b</sup> different from the PSD-Sal group, <sup>e</sup> different from the CTRL-LPS 10  $\mu$ g group, <sup>g</sup> different from the CTRL-LPS 20  $\mu$ g group.

The HVA/DA ratio, an important indicator of DA turnover, had a significant group [ $F(1,70)=19.98$ ;  $p<0.001$ ], treatment [ $F(3,70)=36.30$ ;  $p<0.001$ ], and interaction effects [ $F(3,70)=10.49$ ;  $p<0.001$ ]. PSD and LPS at 5, 10, and 20  $\mu$ g ( $p<0.001$  in all cases) reduced this ratio below its value in the CTRL-Sal group. Only the PSD-LPS 20  $\mu$ g group showed a lower DA turnover ratio than the PSD-Sal group ( $p<0.05$ ) (Fig. 6C and Table 2).

#### 3.4.7. COX-2 protein expression

All of the protein expression analyses were performed by normalizing densitometric values to those obtained from the

saline non-PSD group (control), which were defined as having an optical density of 100%. The other measurements were expressed as percentages of the CTRL-Sal group, with positive percentages indicating COX-2 up-regulation, and negative percentages indicating down-regulation.

No statistical differences were found in the optical density of the bands in the hypothalamus among the different experimental groups ( $p>0.05$ ). In the cortex, however, COX-2 expression showed significant variations among the groups [ $F(7,56)=7.90$ ;  $p<0.001$ ], as depicted in Fig. 7A. The expression was increased in the control animals at all doses of LPS tested: 5  $\mu$ g ( $p<0.05$ ), 10  $\mu$ g ( $p<0.05$ ),

and 20  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.01$ ), based on a Tukey post-hoc test. Similarly, expression was increased in the PSD animals to levels above those of the PSD-Sal group at all LPS doses: 5  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.001$ ), 10  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.001$ ), and 20  $\mu\text{g}$  ( $p < 0.001$ ). Moreover, COX-2 expression in the cortex correlated strongly with the percentage of SWS ( $r = 0.77$ ; Fig. 7B).

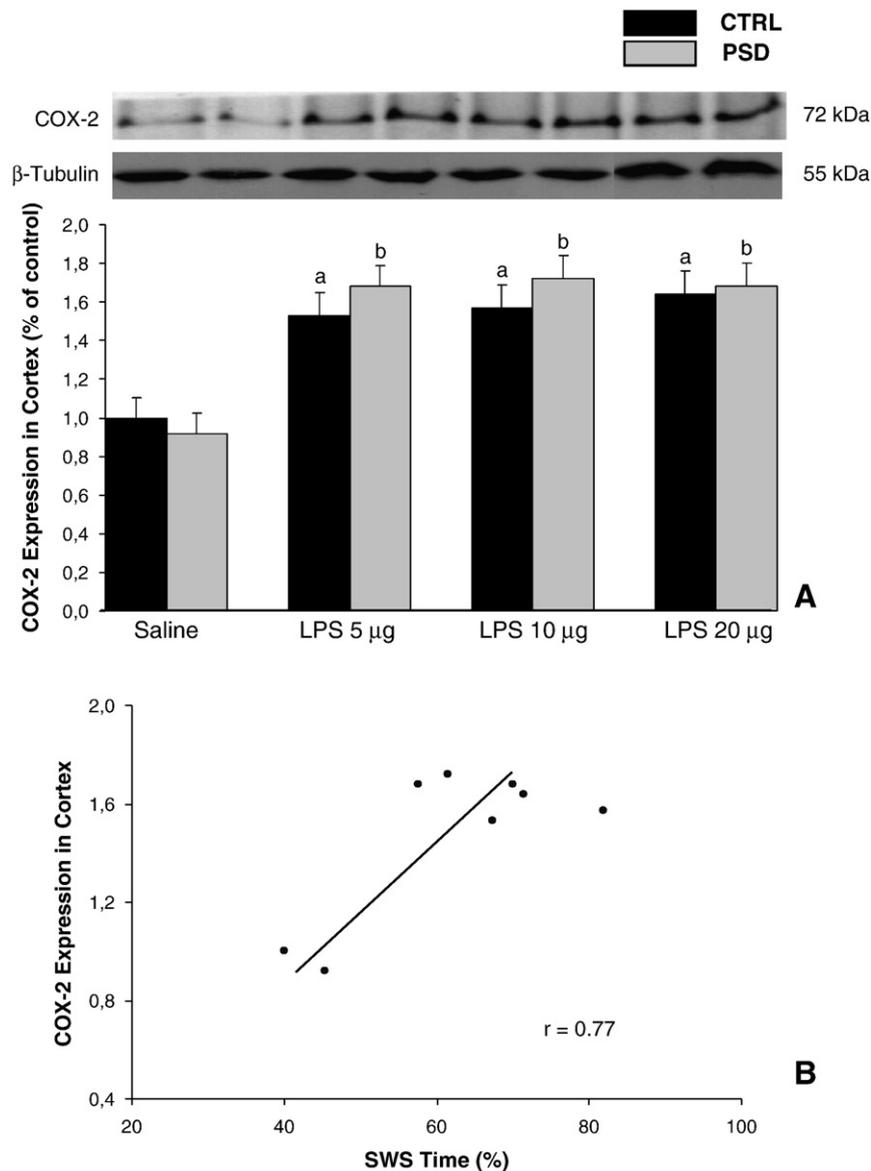
#### 4. Discussion

The results of the present study provide evidence that, when combined, PSD significantly modulates *sickness behavior* in a bidirectional manner. The primary effect of PSD in mice was to render them more susceptible to LPS-induced immobility, such that the animals were sensitive to lower doses of LPS

than in the absence of PSD. In addition, PSD reversed the effects of the highest LPS dose tested in the elevated plus-maze. After PSD, LPS strongly inhibited sleep rebound by suppressing paradoxical sleep. Our molecular experiments found that both PSD and LPS reduce striatal dopaminergic activity, and that LPS increases COX-2 expression in the cortex. In this sense, the present findings provide new insight into how the sleep-wake cycle affects *sickness behavior*, and it indicates some evidence of the neurochemistry and neuroinflammation mediating this relationship.

##### 4.1. PSD method for mice

The multiple platform is a well known method of PSD applied in rats since the mid-1990s (Nunes Junior et al., 1994). It can



**Figure 7** Lipopolysaccharide-induced SWS depends on COX-2 expression in cortex. Panel A shows that COX-2 protein expression in cortex is higher in animals receiving lipopolysaccharide (LPS) than saline. The expression of COX-2 in the cortex correlates closely with the increase of SWS on the first day of recording (Panel B). The values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$ /group). <sup>a</sup> different from the CTRL-Sal group, <sup>b</sup> different from the PSD-Sal group.

completely suppress PS and significantly decrease SWS during the 96 hour period of the protocol. After the PSD, the rats recovered in a PS rebound that can significantly increase the time spent in PS (+187%) (Machado et al., 2004). Our data and a previous study (Silva et al., 2004) have shown that applying the platform method in mice for 72 h can abolish PS during all period and significantly compromise SWS.

A frequent limitation of this methodology is the increase of corticosterone levels inherent of stressful procedures (Andersen et al., 2005b), which acts as a confounding variable that can obscure the PSD effects. The present study, however, showed that corticosterone levels in the saline group were not statistically changed after 72 h of PSD. In addition, changes in corticosterone secretion were observed only in groups receiving LPS, which is consistent with the ability of LPS to activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Turnbull and Rivier, 1995; Beishuizen and Thijs, 2003).

#### 4.2. PSD-induced alterations in sickness behavior

In agreement with previous studies (Kozak et al., 1994; Yirmiya et al., 2001; Swiergiel and Dunn, 2007), our study found LPS to change exploratory behaviors, such as decreasing locomotion frequency and increased immobility time. It is particularly interesting that when mice were treated with both PSD and LPS, they suffered greater impairment than when subjected to LPS alone. This potentiation of motor impairment was observed at all LPS doses tested. Our results indicate that LPS reduced dopaminergic neurotransmission along the nigrostriatal pathway, which possibly influences the altered locomotor behavior. The fact that mice showed this potentiation of impairment even at the lowest dose of LPS suggests that PSD and LPS act synergistically, which is reasonable given that both decrease DA turnover and reduce motor behavior in a dose-dependent fashion.

Our results demonstrated the anxiolytic effect promoted by PSD (Suchecki et al., 2002). However, anxiogenic behavior was not observed in groups receiving only LPS. The fact that LPS did not affect anxiety in these animals is consistent with observed norepinephrine transmission. Our results can be attributed to the fact that LPS strongly inhibits exploratory activity, and differences between our results and studies reporting an anxiogenic effect of LPS may reflect differences in the strains of mice and LPS serotypes used. All these factors can strongly affect norepinephrine pathways, which have been implicated in anxiogenesis (Morilak et al., 2005). We hypothesize that the strain of mice used in the studies reporting anxiogenic effects of LPS are more vulnerable to changes in norepinephrine neurotransmission.

When animals were PS deprived prior to behavioral testing, LPS decreased the number of open arms entries to below the level of the saline group. On the other hand, the difference in time spent in open arms between the control and the PSD groups, as the locomotor activity in the open field, was dose dependent, emphasizing the importance of motor behavior in the elevated plus-maze test (Cruz et al., 1994; Rodgers and Johnson, 1995). Therefore, we can assume that this ability to suspend the normal expression of *sickness behavior* in the face of competing environmental and physiological demands is fundamental to the argument that

*sickness behaviors* are homeostatic responses rather than simply a sign of illness-induced weakness (Hart, 1988; Aubert, 1999; Dantzer, 2001).

#### 4.3. Sleep recovery after PSD and LPS administration

Other important issues addressed in the present study are the changes in the sleep-wake cycle induced by cytokines and whether PSD can affect these changes. Previous studies (Lancel et al., 1995; Opp and Toth, 1998; Mullington et al., 2000; Toth and Opp, 2001; Imeri et al., 2006) and our results point out that experimental LPS administration strongly enhances SWS and reduces PS within the first 12 h after administration. Nevertheless, the current data corroborate with a prior study (Morrow and Opp, 2005) indicating a paradoxical sleep rebound on the subsequent dark period.

When the animals in the present study were paradoxical sleep deprived and subsequently given LPS, no changes were seen in total sleep time or amount of SWS. However, LPS did significantly reduce the amount of PS independently of the dose, demonstrating a suppression of PS rebound. We propose that LPS inhibits the PS rebound by altering overall neurotransmission activity, mainly dopaminergic function. This speculation is consistent with several studies in the literature that show a fundamental role of dopamine (DA) in the regulation of paradoxical sleep (Tufik et al., 1978; Dzirasa et al., 2006; Dahan et al., 2007), and also support the essential role of nigrostriatal pathway for this regulation (Lima et al., 2007; Lima et al., 2008). However, PS rebound is a complex phenomenon that can be triggered and influenced by several other neurotransmitter pathways such as brainstem nuclei (pedunclopontine tegmental, laterodorsal tegmental and pontine reticular formation) and noradrenergic activity, along with action by other substances in the CNS like peripherally released cytokines and COX-2 expression, both of these affected by LPS administration.

It is worth noting that neither PSD nor LPS administration caused animal death during the 2 days of sleep recovery. Although no statistical differences were found, treating animals with LPS following PSD increased the group mortality rates by 20% and 40%, respectively, for the LPS doses of 10 µg and 20 µg. This unexpected finding suggests that lack of paradoxical sleep increases susceptibility to septic shock caused by higher doses of LPS, and it supports the hypothesis that sleep is essential for proper immune response.

#### 4.4. COX-2 expression and neurotransmitter activity

Regarding COX-2 expression, only the animals receiving LPS showed elevated levels of this inflammatory protein in the cortex, regardless of whether they had been PSD or not. Although this enzyme participates on the LPS-induced alterations of feeding behavior (Johnson et al., 2002; Swiergiel and Dunn, 2002; Dunn et al., 2006), our observations pointed to a marked correlation between COX-2 expression and SWS. This finding provides new insights about the participation of COX-2 and prostaglandin cascade on expression of spontaneous and cytokine-induced SWS (Terao et al., 1998a; Terao et al., 1998b; Yoshida et al., 2003).

In addition, it is well known that the immune system communicates with the CNS through chemical messengers that trigger several changes in central neurotransmission in adults (for review, see [Dunn, 2006](#)) and prenatal ([Romero et al., 2007](#)) LPS exposure. However, the analysis of DA and DA turnover in our study raises the following question: given that LPS inhibits exploratory behaviors and suppresses paradoxical sleep rebound induced by PSD, does LPS exert these effects simply by decreasing dopaminergic function, as indicated by changes in DA turnover, or can LPS trigger antagonism of dopaminergic receptors? Dopaminergic antagonists such as haloperidol decrease locomotor activity ([Conceicao and Frussa-Filho, 1996](#)) and suppress PS rebound ([Lima et al., 2008](#)), similar to the LPS effects observed here. We therefore hypothesize that this possible blockage of DA receptors may act synergistically with the decreased DA synthesis ([Qin et al., 2007](#); [Liu et al., 2008](#)) and striatal DA turnover provoking all these behavioral effects when PSD are associated with LPS.

## 5. Conclusions

Sleep is a key modulator of behavioral responses to immune activation and exerts these effects mostly through changes in neurotransmission and inflammatory protein expression in the CNS. Thus, this study provides new insights into the neurochemical and neuroinflammatory basis of the relationship between sleep and *sickness behavior*.

## Role of funding source

This work was supported by grants from the Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP), CNPq, and FAPESP (CEPID #98/14303-3 to ST, 06/58275-1 to AZ and 04/02213-2 to RBM). AFIP, CNPq, and FAPESP had no further role in the study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

## Contributors

AZ, MLA, ST and MMSL conceived and designed the experiments. AZ, MMSL, ABR, and RBM performed the experiments. AZ, MMSL, and RBM analyzed the data. MLA, RBM, and ST contributed with reagents, materials, and analysis tools. AZ, MLA, MMSL, and RBM wrote the paper.

## Conflict of interest

The authors have declared that no competing interests exist.

## Acknowledgements

We would like to thank the staff of our animal facility for the care of the mice used in this study. The authors would also like to express their cordial thanks to Francieli Ruiz, Andressa Silva, Waldermaks Leite, Marilde Costa, Fúlvio Mendes, and Cristiano Resende for their assistance during the project.

## References

Abraham, J., Johnson, R.W., 2009. Central inhibition of interleukin-1beta ameliorates sickness behavior in aged mice. *Brain Behav Immun.* 23 (3), 396–401.

- Andersen, M., D'Almeida, V., Ko, G., Kawakami, R., Martins, P., Magalhães, L., Tufik, S., 2004. Ethical and Practical Principles on the Use of Laboratory Animals, São Paulo.
- Andersen, M.L., Antunes, I.B., Tufik, S., 2005a. Noradrenergic system interacts with genital reflexes induced by cocaine in paradoxical sleep-deprived male rats. *Behav. Neurosci.* 119, 473–482.
- Andersen, M.L., Martins, P.J., D'Almeida, V., Bignotto, M., Tufik, S., 2005b. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J. Sleep Res.* 14, 83–90.
- Andersen, M.L., Tufik, S., 2006. Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res. Rev.* 51, 136–143.
- Aubert, A., 1999. Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 1029–1036.
- Bass, J., Turek, F.W., 2005. Sleepless in America: a pathway to obesity and the metabolic syndrome? *Arch. Intern. Med.* 165, 15–16.
- Beishuizen, A., Thijs, L.G., 2003. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J. Endotoxin. Res.* 9, 3–24.
- Blanque, R., Meakin, C., Millet, S., Gardner, C.R., 1996. Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha. *Gen. Pharmacol.* 27, 973–977.
- Cohn, D.W., de Sa-Rocha, L.C., 2006. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. *Physiol. Behav.* 87, 932–937.
- Conceicao, I.M., Frussa-Filho, R., 1996. Effects of microgram doses of haloperidol on open-field behavior in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53, 833–838.
- Cruz, A.P., Frei, F., Graeff, F.G., 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 171–176.
- Dahan, L., Astier, B., Vautrelle, N., Urbain, N., Kocsis, B., Chouvet, G., 2007. Prominent burst firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area during paradoxical sleep. *Neuropsychopharmacology* 32, 1232–1241.
- Dantzer, R., 2001. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 933, 222–234.
- 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. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 46–56.
- Dunn, A.J., 1992. The role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in the neurochemical and neuroendocrine responses to endotoxin. *Brain Res. Bull.* 29, 807–812.
- Dunn, A.J., 2006. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin. Neurosci. Res.* 6, 52–68.
- Dunn, A.J., Chuluyan, H.E., 1992. The role of cyclo-oxygenase and lipoxygenase in the interleukin-1-induced activation of the HPA axis: dependence on the route of injection. *Life Sci.* 51, 219–225.
- Dunn, A.J., Swiergiel, A.H., de Beaurepaire, R., 2005. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 891–909.
- Dunn, A.J., Swiergiel, A.H., Zhang, H., Quan, N., 2006. Reduced ingestion of sweetened milk induced by interleukin-1 and lipopolysaccharide is associated with induction of cyclooxygenase-2 in brain endothelia. *Neuroimmunomodulation* 13, 96–104.
- Dunn, A.J., Wang, J., Ando, T., 1999. Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv. Exp. Med. Biol.* 461, 117–127.
- Dzirasa, K., Ribeiro, S., Costa, R., Santos, L.M., Lin, S.C., Grosmark, A., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Nicoletis, M.A., 2006. Dopaminergic control of sleep–wake states. *J. Neurosci.* 26, 10577–10589.
- Everson, C.A., 1993. Sustained sleep deprivation impairs host defense. *Am. J. Physiol.* 265, R1148–1154.
- Everson, C.A., 2005. Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1054–1063.

- Everson, C.A., Toth, L.A., 2000. Systemic bacterial invasion induced by sleep deprivation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R905–916.
- Frussa-Filho, R., Goncalves, M.T., Andersen, M.L., de Araujo, N.P., Chinen, C.C., Tufik, S., 2004. Paradoxical sleep deprivation potentiates amphetamine-induced behavioural sensitization by increasing its conditioned component. *Brain Res.* 1003, 188–193.
- Harden, L.M., du Plessis, I., Poole, S., Laburn, H.P., 2008. Interleukin (IL)-6 and IL-1 beta act synergistically within the brain to induce sickness behavior and fever in rats. *Brain Behav. Immun.* 22, 838–849.
- Hart, B.L., 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12, 123–137.
- Hart, B.L., 1990. Behavioral adaptations to pathogens and parasites: five strategies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14, 273–294.
- Hipolide, D.C., Tufik, S., Raymond, R., Nobrega, J.N., 1998. Heterogeneous effects of rapid eye movement sleep deprivation on binding to alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes in rat brain. *Neuroscience* 86, 977–987.
- Imeri, L., Bianchi, S., Opp, M.R., 2006. Inhibition of caspase-1 in rat brain reduces spontaneous nonrapid eye movement sleep and nonrapid eye movement sleep enhancement induced by lipopolysaccharide. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R197–204.
- Irwin, M., Mascovich, A., Gillin, J.C., Willoughby, R., Pike, J., Smith, T.L., 1994. Partial sleep deprivation reduces natural killer cell activity in humans. *Psychosom. Med.* 56, 493–498.
- Irwin, M., McClintick, J., Costlow, C., Fortner, M., White, J., Gillin, J.C., 1996. Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. *Faseb J.* 10, 643–653.
- Jain, N.K., Kulkarni, S.K., Singh, A., 2001. Lipopolysaccharide-mediated immobility in mice: reversal by cyclooxygenase enzyme inhibitors. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 23, 441–444.
- Johnson, P.M., Vogt, S.K., Burney, M.W., Muglia, L.J., 2002. COX-2 inhibition attenuates anorexia during systemic inflammation without impairing cytokine production. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E650–656.
- Kozak, W., Conn, C.A., Kluger, M.J., 1994. Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice. *Am. J. Physiol.* 266, R125–135.
- Kripke, D.F., Garfinkel, L., Wingard, D.L., Klauber, M.R., Marler, M.R., 2002. Mortality associated with sleep duration and insomnia. *Arch. Gen. Psychiatry* 59, 131–136.
- Lacosta, S., Merali, Z., Anisman, H., 1999. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. *Brain Res.* 818, 291–303.
- Lancel, M., Cronlein, J., Muller-Preuss, P., Holsboer, F., 1995. Lipopolysaccharide increases EEG delta activity within non-REM sleep and disrupts sleep continuity in rats. *Am. J. Physiol.* 268, R1310–1318.
- Lange, T., Perras, B., Fehm, H.L., Born, J., 2003. Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination. *Psychosom. Med.* 65, 831–835.
- Lima, M.M.S., Andersen, M.L., Reksidler, A.B., Silva, A., Zager, A., Zanata, S.M., Vital, M.A., Tufik, S., 2008. Blockage of dopaminergic D(2) receptors produces decrease of REM but not of slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. *Behav Brain Res.* 188, 406–411.
- Lima, M.M.S., Andersen, M.L., Reksidler, A.B., Vital, M.A., Tufik, S., 2007. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS ONE* 2, e513.
- Lima, M.M.S., Braga Reksidler, A., Marques Zanata, S., Bueno Machado, H., Tufik, S., Vital, M.A., 2006. Different Parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res.* 1101, 117–125.
- Liu, Y., Qin, L., Wilson, B., Wu, X., Qian, L., Granholm, A.C., Crews, F.T., Hong, J.S., 2008. Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantia nigra and motor behavioral deficits. *Neurotoxicology* 29 (5), 864–870.
- 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 Res.* 1004, 45–51.
- Machado, R.B., Tufik, S., Suchecki, D., 2008. Chronic stress during paradoxical sleep deprivation increases paradoxical sleep rebound: association with prolactin plasma levels and brain serotonin content. *Psychoneuroendocrinology.*
- Morilak, D.A., Barrera, G., Echevarria, D.J., Garcia, A.S., Hernandez, A., Ma, S., Petre, C.O., 2005. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 1214–1224.
- Morrow, J.D., Opp, M.R., 2005. Diurnal variation of lipopolysaccharide-induced alterations in sleep and body temperature of interleukin-6-deficient mice. *Brain Behav. Immun.* 19, 40–51.
- Mullington, J., Korth, C., Hermann, D.M., Orth, A., Galanos, C., Holsboer, F., Pollmacher, T., 2000. Dose-dependent effects of endotoxin on human sleep. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R947–955.
- Nunes Junior, G.P., Tufik, S., Nobrega, J.N., 1994. Autoradiographic analysis of D1 and D2 dopaminergic receptors in rat brain after paradoxical sleep deprivation. *Brain Res. Bull.* 34, 453–456.
- Opp, M.R., Toth, L.A., 1998. Somnogenic and pyrogenic effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide in intact and vagotomized rats. *Life Sci.* 62, 923–936.
- Paxinos, G., Franklin, K., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York.
- Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.S., Knapp, D. J., Crews, F.T., 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55, 453–462.
- Renault, J., Gheusi, G., Aubert, A., 2008. Changes in social exploration of a lipopolysaccharides-treated conspecific in mice: role of environmental cues. *Brain Behav. Immun.*
- Rodgers, R.J., Johnson, N.J., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52, 297–303.
- Romero, E., Ali, C., Molina-Holgado, E., Castellano, B., Guaza, C., Borrell, J., 2007. Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics. *Neuropsychopharmacology* 32, 1791–1804.
- Ruiz, F.S., Andersen, M.L., Zager, A., Martins, R.C., Tufik, S., 2007. Sleep deprivation reduces the lymphocyte count in a non-obese mouse model of type 1 diabetes mellitus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 633–637.
- 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 Rde, A., Tufik, S., Frussa-Filho, R., 2004. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology* 46, 895–903.
- Spiegel, K., Sheridan, J.F., Van Cauter, E., 2002. Effect of sleep deprivation on response to immunization. *Jama* 288, 1471–1472.
- Suchecki, D., Tiba, P.A., Tufik, S., 2002. Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. *J. Neuroendocrinol.* 14, 549–554.
- Swiergiel, A.H., Dunn, A.J., 2002. Distinct roles for cyclooxygenases 1 and 2 in interleukin-1-induced behavioral changes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 1031–1036.
- Swiergiel, A.H., Dunn, A.J., 2007. Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 651–659.
- Swiergiel, A.H., Smagin, G.N., Johnson, L.J., Dunn, A.J., 1997. The role of cytokines in the behavioral responses to endotoxin and influenza virus infection in mice: effects of acute and chronic administration of the interleukin-1-receptor antagonist (IL-1ra). *Brain Res.* 776, 96–104.

- Takao, T., Tracey, D.E., Mitchell, W.M., De Souza, E.B., 1990. Interleukin-1 receptors in mouse brain: characterization and neuronal localization. *Endocrinology* 127, 3070–3078.
- Teeling, J.L., Perry, V.H., 2008. Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience* 158 (3), 1062–1073.
- Terao, A., Matsumura, H., Saito, M., 1998a. Interleukin-1 induces slow-wave sleep at the prostaglandin D2-sensitive sleep-promoting zone in the rat brain. *J. Neurosci.* 18, 6599–6607.
- Terao, A., Matsumura, H., Yoneda, H., Saito, M., 1998b. Enhancement of slow-wave sleep by tumor necrosis factor-alpha is mediated by cyclooxygenase-2 in rats. *Neuroreport* 9, 3791–3796.
- Toth, L.A., Opp, M.R., 2001. Cytokine- and microbially induced sleep responses of interleukin-10 deficient mice. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1806–1814.
- Tufik, S., Lindsey, C.J., Carlini, E.A., 1978. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology* 16, 98–105.
- Turnbull, A.V., Rivier, C., 1995. Regulation of the HPA axis by cytokines. *Brain Behav. Immun.* 9, 253–275.
- Wingard, D.L., Berkman, L.F., 1983. Mortality risk associated with sleeping patterns among adults. *Sleep* 6, 102–107.
- Yirmiya, R., 1996. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res.* 711, 163–174.
- Yirmiya, R., Pollak, Y., Barak, O., Avitsur, R., Ovadia, H., Bette, M., Weihe, E., Weidenfeld, J., 2001. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. *Neuropsychopharmacology* 24, 531–544.
- Yoshida, H., Kubota, T., Krueger, J.M., 2003. A cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates spontaneous and TNF-alpha-induced non-rapid eye movement sleep in rabbits. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R99–109.
- Zager, A., Andersen, M.L., Ruiz, F.S., Antunes, I.B., Tufik, S., 2007. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R504–509.
- Zee, P.C., Turek, F.W., 2006. Sleep and health: everywhere and in both directions. *Arch. Intern. Med.* 166, 1686–1688.
- Zuckerman, S.H., Shellhaas, J., Butler, L.D., 1989. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis: effects of endogenous and exogenous glucocorticoids and the role of the pituitary-adrenal axis. *Eur. J. Immunol.* 19, 301–305.