

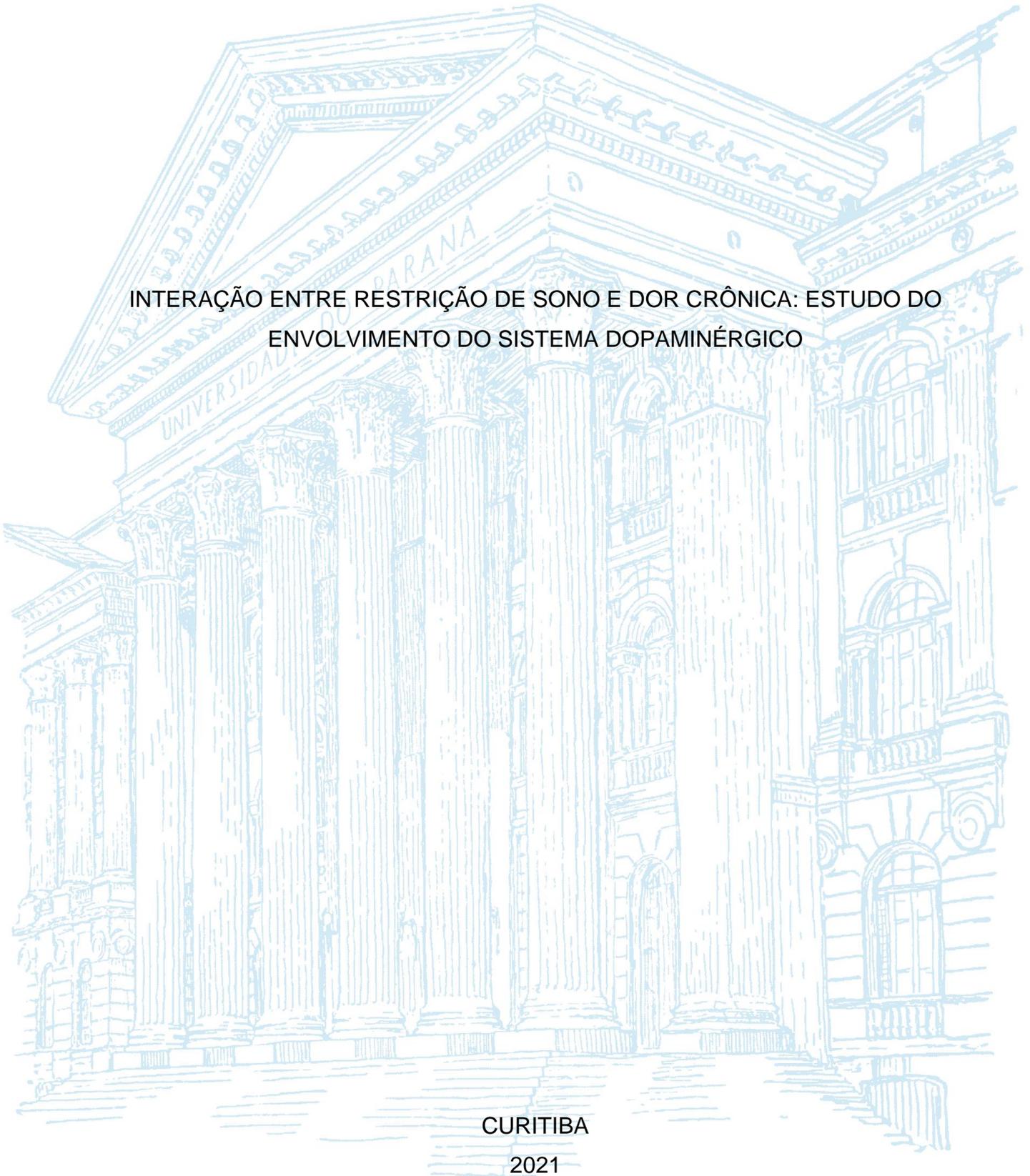
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANA LOLIS

INTERAÇÃO ENTRE RESTRIÇÃO DE SONO E DOR CRÔNICA: ESTUDO DO
ENVOLVIMENTO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO

CURITIBA

2021



FABIANA LOLIS

INTERAÇÃO ENTRE RESTRIÇÃO DE SONO E DOR CRÔNICA: ESTUDO DO
ENVOLVIMENTO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO

TCC apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Luana Fischer

CURITIBA

2021

À minha mãe, que me motivou a persistir e a concluir este trajeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, Profa. Dra. Luana Fischer, por toda a compreensão e dedicação ao me guiar, não somente na execução deste trabalho e ao longo da minha Iniciação Científica, mas também em momentos de dificuldade pessoal.

À Ana Carolina Pescador, por ter ido muito além do que precisava ao me ensinar e ajudar do início ao fim da minha IC. Por sua paciência, tolerando e corrigindo meus erros. E por seu amor à pesquisa e perspicácia, que me fazem admirá-la profundamente.

À Natália Fantin Sardi, a primeira pessoa do laboratório com quem tive contato e quem cedeu seu tempo e atenção para me apresentá-lo. Sua dedicação e generosidade foram de inestimável valor para a realização deste trabalho.

À Eliza Piccoli dos Santos e à Vivian Heimbecker, minhas companheiras de graduação e amigas para além dela. São duas das pessoas mais valiosas que já tive o prazer de conhecer.

E, por fim, à minha família. À minha mãe, Sueli Terezinha Rohden, que foi meu maior suporte durante toda minha vida, em especial neste ano conturbado. Sua história sempre irá me inspirar. Ao meu irmão, Fabio Lolis, por muitas vezes ter aliviado minhas preocupações com sua companhia. E ao meu pai, por me apoiar de todas as formas na concretização do meu sonho de cursar Biomedicina na UFPR.

“Nada pode parecer mais ilimitado à primeira vista do que o pensamento humano, que não apenas escapa a toda autoridade e a todo poder do homem, mas também nem sempre é contido nos limites da natureza e da realidade.”

– DAVID HUME, 1748.

RESUMO

Dor e diminuição do tempo de sono são problemas de saúde pública que possuem relação causal bidirecional. Dados clínicos e experimentais apontam que a ausência de sono adequado aumenta a sensibilidade à dor. Um trabalho recente do laboratório utilizou-se de um modelo animal de hiperalgesia crônica, no qual ratos *Wistar* são submetidos a um período de 14 dias de injeções de PGE₂, resultando na diminuição do limiar nociceptivo, caracterizada como hiperalgesia, que se cronifica e permanece mesmo após a interrupção das injeções. Manipulações capazes de facilitar a cronificação reduzem para sete o número de injeções diárias de PGE₂ necessárias para induzir hiperalgesia crônica. Com isso, a hipótese inicial do trabalho era de que a restrição de sono (RS) atuaria como facilitadora. Contrariando essa hipótese, o quadro de hiperalgesia crônica não foi estabelecido. Não obstante, após os animais retornarem aos valores nociceptivos basais, uma nova injeção de PGE₂ foi administrada. Surpreendentemente, esses animais que foram submetidos a RS e a sete injeções de PGE₂ não desenvolveram hiperalgesia após a administração de PGE₂, mesmo após 14 injeções, o que sugere que RS associada a condições inflamatórias pode induzir um efeito protetor no desenvolvimento da dor crônica. O presente estudo demonstrou que o efeito protetor pode estar relacionado à hipofunção da atividade dopaminérgica mesolímbica. Foi observado que o aumento sistêmico de dopamina induzido pela administração de Prolopa aboliu o efeito protetor de 14 dias de RS + 7 dias de PGE₂. Além disso, o aumento da disponibilidade de dopamina no Núcleo Accumbens, induzido pela administração intra-NAc de GBR (um inibidor seletivo da recaptação de dopamina), também aboliu o efeito protetor de 14 dias de RS + 7 dias de PGE₂. Esses são os primeiros dados na literatura que demonstram que o desenvolvimento da dor crônica pode ser prevenido por manipulações fisiológicas e sugerem um possível mecanismo para este fenômeno. Evidentemente, esses dados trazem à luz uma importante ferramenta para o entendimento do processo de cronificação da dor.

Palavras-chave: Dor crônica; Nocicepção; Restrição de sono; Prostaglandina E₂; Dopamina; Sistema mesolímbico.

ABSTRACT

Pain and reduction of sleep time are public health problems that have a bidirectional causal relationship. Clinical and experimental data point out that inadequate sleep increases pain sensitivity. A recent study from our laboratory used a chronic hyperalgesia animal model in which Wistar rats are submitted to a period of 14 days of PGE₂ injections, resulting in the reduction of the nociceptive threshold, defined as hyperalgesia, which becomes chronic and remains even after the injections are ceased. Manipulations capable of facilitating chronicity reduce the number of daily PGE₂ injections needed to induce chronic hyperalgesia to seven. Thus, the initial hypothesis of the work was that sleep restriction (SR) would act as a facilitator. Contrary to this hypothesis, the state of chronic hyperalgesia has not been established. However, after the animals returned to baseline nociceptive values, a new injection of PGE₂ was administered. Surprisingly, those animals that underwent SR and seven PGE₂ injections did not develop hyperalgesia after PGE₂ administration, even after 14 injections, suggesting that SR associated with inflammatory conditions may induce a protective effect on the development of chronic pain. The present study demonstrated that the protective effect may be related to the hypofunction of mesolimbic dopaminergic activity. It was observed that the systemic increase in dopamine induced by the administration of Prolopa abolished the protective effect of 14 days of SR + 7 days of PGE₂. Furthermore, the increased availability of dopamine in Nucleus Accumbens, induced by intra-NAc administration of GBR (a selective dopamine reuptake inhibitor), also abolished the protective effect of 14 days of SR + 7 days of PGE₂. These are the first data in the literature to demonstrate that the development of chronic pain can be prevented by physiological manipulations and suggest a possible mechanism for this phenomenon. Evidently, these data bring to light an important tool for understanding the chronic pain process.

Key-words: Chronic pain. Nociception. Sleep restriction. Prostaglandin E₂. Dopamine. Mesolimbic system.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1A – EFEITO PRÓ-NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ASSOCIAÇÃO ENTRE 14 DIAS DE RS E INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE ₂ DURANTE OS 7 DIAS FINAIS	20
GRÁFICO 1B – EFEITO PERSISTENTE DA PGE ₂ EM ANIMAIS PREVIAMENTE EXPOSTOS À RS DURANTE 14 DIAS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE ₂ DURANTE OS ÚLTIMOS 7 DIAS	21
GRÁFICO 2A – EFEITO PRÓ-NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ASSOCIAÇÃO ENTRE 14 DIAS DE RS E INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE ₂ DURANTE OS 7 DIAS FINAIS EM ANIMAIS TRATADOS COM PROLOPA OU SALINA DURANTE O PERÍODO DE SONO REBOTE (RECUPERAÇÃO)	34
GRÁFICO 2B – EFEITO DA PROLOPA ADMINISTRADA NO PERÍODO DE REBOTE DE SONO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA AGUDA INDUZIDA POR 3 NOVAS INJEÇÕES DE PGE ₂ APÓS RETORNO AO LIMAR BASAL	36
GRÁFICO 3A – EFEITO PRÓ-NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ASSOCIAÇÃO ENTRE 14 DIAS DE RS E INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE ₂ DURANTE OS 7 DIAS FINAIS EM ANIMAIS TRATADOS COM GBR OU SALINA DO 2º AO 5º DIA DE REBOTE DE SONO	37
GRÁFICO 3B – EFEITO DO GBR ADMINISTRADO NO PERÍODO DE REBOTE DE SONO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA AGUDA INDUZIDA POR 3 NOVAS INJEÇÕES DE PGE ₂ APÓS RETORNO AO LIMAR BASAL	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PLANEJAMENTO E DISPOSIÇÃO TEMPORAL DO EXPERIMENTO “A”	32
FIGURA 2 – PLANEJAMENTO E DISPOSIÇÃO TEMPORAL DO EXPERIMENTO “B”	33

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

A _{2A}	- Receptor de Adenosina do tipo A _{2A}
ACC	- Córtex Cingulado Anterior, do inglês <i>Anterior Cingulate Cortex</i>
ANOVA	- Análise de Variância
D ₁	- Receptores de Dopamina do tipo D ₁
D ₂	- Receptores de Dopamina do tipo D ₂
EPISONO	- Instituto do Sono de São Paulo
GBR	- GBR12909 dicloridrato de piperazina, inibidor seletivo da recaptação de dopamina
IASP	- Associação Internacional para o Estudo da Dor, do inglês <i>International Association for the Study of Pain</i>
PAG	- Substância Cinzenta Periaquedutal, do inglês <i>Periaqueductal Gray</i>
PFC	- Córtex Pré-Frontal, do inglês <i>Prefrontal Cortex</i>
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
REM	- Movimento Rápido dos Olhos, do inglês <i>Rapid Eye Movement</i>
RS	- Restrição de sono
NAc	- Núcleo Accumbens
VTA	- Área Tegmentar Ventral, do inglês <i>Ventral Tegmental Area</i>
RVM	- Bulbo Rostroventral, do inglês <i>Rostral Ventral Medulla</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	JUSTIFICATIVA.....	22
1.2	OBJETIVOS	23
1.2.1	Objetivo geral	23
1.2.2	Objetivos específicos.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	SONO	24
2.2	DOR.....	25
2.3	CRONIFICAÇÃO DA DOR	26
2.4	RELAÇÃO ENTRE DOR E SONO.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	ANIMAIS.....	29
3.2	DROGAS	29
3.3	MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA CRÔNICA	29
3.4	RESTRIÇÃO DE SONO	30
3.5	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA CANULAÇÃO INTRA-NAC.....	30
3.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	31
3.7	ANÁLISE DE DADOS.....	31
3.8	DESENHO EXPERIMENTAL	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	RETORNO AO LIMIAR BASAL: PROLOPA.....	33
4.2	O AUMENTO SISTÊMICO DE DOPAMINA PREVINE O EFEITO PROTETOR	35
4.3	RETORNO AO LIMIAR BASAL: GBR	37
4.4	O AUMENTO DA DISPONIBILIDADE DE DOPAMINA NO NÚCLEO ACCUMBENS PREVINE O EFEITO PROTETOR	38
4.5	CAMPO ABERTO: PROLOPA	40
4.6	CAMPO ABERTO: GBR	41
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	42
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

Distúrbios de sono e condições de dor persistentes são problemas de saúde pública mundiais (ARTNER et al., 2013; KIM et al., 2015). De acordo com a *International Association for the Study of Pain* (IASP), quando a dor se estende por mais de três meses, estando presente na maioria dos dias, é descrita clinicamente como dor crônica (TREEDE, 2019). O tratamento de dores crônicas é um desafio, visto que medicamentos comumente utilizados para o tratamento de dor aguda, como opióides, antiinflamatórios não esteroidais (AINES) e acetaminofeno (paracetamol) são pouco eficazes para esse tipo de condição (KREBS et al., 2018), especialmente devido aos efeitos colaterais associados ao uso prolongado desses fármacos (CARTER et al., 2014). Está bem claro na literatura que existe uma relação bidirecional entre dor e sono. De forma que a escassez de sono aumenta o risco de desenvolvimento de dores persistentes e dores persistentes reduzem a qualidade (KARAMAN et al., 2014; SRIBASTAV et al., 2017) e o tempo (HERRERO BABILLONI et al., 2019) de sono. Dados clínicos também apontam que distúrbios de sono estão presentes em até 88% dos pacientes com dor crônica (MORIN et al., 2006; CHEATLE et al., 2016) e pelo menos 50% dos indivíduos com insônia sofrem de dor crônica (TAYLOR et al., 2007). De fato, trabalhos recentes do nosso laboratório mostram que a privação de sono aumenta a sensibilidade à dor em ratos (SARDI et al., 2018a; SARDI et al., 2018b). O entendimento dos mecanismos pelos quais o prejuízo de sono afeta a dor é essencial para incentivar o desenvolvimento de novas drogas e intervenções comportamentais que impactariam o manejo clínico e, de modo geral, a saúde pública e a prevenção da dor.

Nosso conhecimento sobre como a deficiência de sono afeta a dor têm avançado significativamente nos últimos anos. Diversos modelos experimentais de privação ou restrição de sono têm sido usados para demonstrar que o sono insuficiente reduz o limiar nociceptivo (TOMIM et al., 2016; SARDI et al., 2018a; KRAUSE et al., 2019) e aumenta a dor já existente (CHEATLE et al., 2016; TOMIM et al., 2016). Os mecanismos por trás desse efeito pró-nociceptivo são pouco compreendidos e aparentemente envolvem vários sistemas de neurotransmissores e regiões encefálicas (SARDI et al., 2018a; SARDI et al., 2018b; HAACK et al., 2019). Há evidências, ainda, de que sono insuficiente é um fator que resulta em

anormalidades no funcionamento de mecanismos de modulação endógena da dor (TOMIM et al., 2016; HAACK et al., 2019). Por exemplo, resultados de um estudo do nosso laboratório sugerem que o efeito pró-nociceptivo da restrição de sono é dependente da alteração no funcionamento do mais conhecido sistema de modulação da dor, o sistema descendente PAG-RVM (Substância Cinzenta Periaquedutal-Bulbo Rostroventral) (TOMIM et al., 2016). De fato, disfunções dos sistemas de inibição da dor são mais prevalentes em indivíduos com insônia do que em indivíduos sem distúrbios de sono (HAACK et al., 2012). Ademais, diversas regiões do cérebro que participam de mecanismos de modulação da dor também atuam na regulação do ciclo de sono e vigília, dentre elas a Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) e o Núcleo Accumbens (NAc) (ZHANG et al., 2013; OSSIPOV, MORIMURA e PORRECA, 2014; HARRIS e PENG, 2019).

O componente afetivo da dor já foi apontado como um fator mais importante na experiência da dor crônica do que mecanismos nociceptivos (MANSOUR et al., 2014). O componente afetivo da dor depende especialmente do sistema límbico, um conjunto de estruturas corticais e subcorticais interligadas morfológica e funcionalmente relacionadas à emoção, ao aprendizado (MACHADO e HAERTEL, 2013) e a comportamentos motivados (SERAFINI, PRYCE e ZACHARIOU, 2019). O Núcleo Accumbens (NAc), uma das estruturas que compõem o sistema límbico, e o Córtex Pré-Frontal (PFC), recebem projeções dopaminérgicas do mesencéfalo a partir da Área Tegmentar Ventral (VTA). Tais projeções constituem a via dopaminérgica mesocorticolímbica, responsável por respostas de motivação e prazer no encéfalo (sistema de recompensa) (SERAFINI, PRYCE e ZACHARIOU, 2019). Além de suas funções clássicas, evidências recentes apontam para um envolvimento da via dopaminérgica mesolímbica na modulação da dor aguda e crônica (DIAS et al., 2015; SARDI et al., 2018a; SARDI et al., 2018b; SERAFINI, PRYCE e ZACHARIOU, 2019; VERGARA et al., 2020)

A participação da via dopaminérgica mesolímbica tanto em mecanismos de modulação da dor (DIAS et al., 2015; SARDI et al., 2018a; SARDI et al., 2018b; SERAFINI, PRYCE e ZACHARIOU, 2019; VERGARA et al., 2020) quanto de regulação do ciclo sono-vigília (ZHANG et al., 2013; OSSIPOV, MORIMURA e PORRECA, 2014; HARRIS e PENG, 2019) também sugere uma relação entre os dois processos. Essa hipótese é reforçada por resultados do nosso laboratório que

demonstram que a privação de sono REM (*Rapid Eye Movement*) ou a restrição crônica de sono induz aumento da resposta nociceptiva de forma dependente do NAc (SARDI et al., 2018a; SARDI et al., 2018b). Além disso, o efeito pró-nociceptivo da privação de sono REM depende da redução da atividade de receptores D₂ no NAc (SARDI et al., 2018b).

Tanto a dor fisiológica quanto a dor crônica estão intimamente relacionadas com a atividade da dopamina no sistema mesolímbico. No entanto, essa relação apresenta caráter duplo: em indivíduos saudáveis, um estímulo nocivo induz a liberação de dopamina como mecanismo motivador, mas em indivíduos com dor crônica, observa-se uma redução dos níveis de dopamina (TAYLOR et al., 2016). Não obstante, resultados do nosso laboratório colaboram com a ideia de que a transição da dor aguda para dor crônica depende da atividade dopaminérgica no sistema mesolímbico, visto que a lesão de neurônios dopaminérgicos da Área Tegmentar Ventral (VTA) abole a cronificação da dor em ratos, mas uma vez que a dor tenha se tornado crônica, tal lesão não mais a afeta (VERGARA et al., 2020). De fato, o bloqueio de receptores D₂ no NAc também abole a cronificação da dor (DIAS et al., 2015) e conforme a dor progride do quadro agudo para o crônico em modelo animal de hiperalgesia crônica, os níveis de dopamina no NAc sofrem redução (VERGARA et al., 2020). Esses achados indicam um papel complexo da dopamina mesolímbica na dor crônica, em que a cronificação da dor depende da ativação de vias dopaminérgicas no sistema mesolímbico mas, após estabelecida, a dor crônica está relacionada a uma redução dessa ativação. Contudo, os mecanismos responsáveis pela associação entre a dopamina e cronificação da dor e o estado de dor crônica permanecem desconhecidos.

Embora seja claro que a diminuição do tempo ou da qualidade do sono aumenta a dor, ainda não foi identificada uma relação causal direta entre distúrbios do sono e aumento no risco de desenvolver dor crônica, haja vista a dificuldade de isolá-los de fatores psicossociais e comorbidades (CHOY, 2015; CREED, 2020). Portanto, em um trabalho anterior de nosso laboratório (PESCADOR, 2019) levantamos a hipótese de que um período relativamente longo de restrição de sono poderia facilitar o processo de cronificação da dor em animais. Para testar essa hipótese utilizamos o modelo desenvolvido por Ferreira e colaboradores em que ratos *Wistar* submetidos a injeções diárias de PGE₂ na pata traseira durante 14 dias

(fase de indução da hiperalgesia persistente) entram em um quadro de hiperalgesia crônica, que perdura por no mínimo 30 dias sem qualquer intervenção adicional (fase de manutenção) (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990). A hiperalgesia se caracteriza pelo aumento da resposta nociceptiva (PURVES et al., 2001), é um fenômeno comum a todas as dores inflamatórias e a grande parte das dores neuropáticas (COSTIGAN et al., 2009). Experimentalmente se verifica pela redução do limiar nociceptivo a diferentes tipos de estímulos, como os mecânicos.

Nesse modelo, se as injeções diárias de PGE₂ forem associadas a uma intervenção que facilita a cronificação da dor, apenas 7 dias de injeção de PGE₂ são suficientes para induzir hiperalgesia crônica, ou seja, redução crônica do limiar nociceptivo mecânico (DIAS et al., 2015). Então privamos os animais de sono por 6 horas diárias durante os 7 dias de injeções de PGE₂, esperando que a associação entre restrição de sono e 7 dias de injeções de PGE₂ fosse suficiente para induzir hiperalgesia crônica. Contrariando nossa hipótese, a restrição de sono não facilitou a cronificação e os animais rapidamente retornaram ao limiar nociceptivo basal. Insistimos na hipótese, aumentando para 14 os dias de RS com injeções diárias de PGE₂ nos últimos 7 dias. Mais uma vez, foi observado que os animais não desenvolveram dor crônica, refutando nossa hipótese de que a RS atuaria como facilitadora do processo de cronificação da dor (Figura 1A).

1A

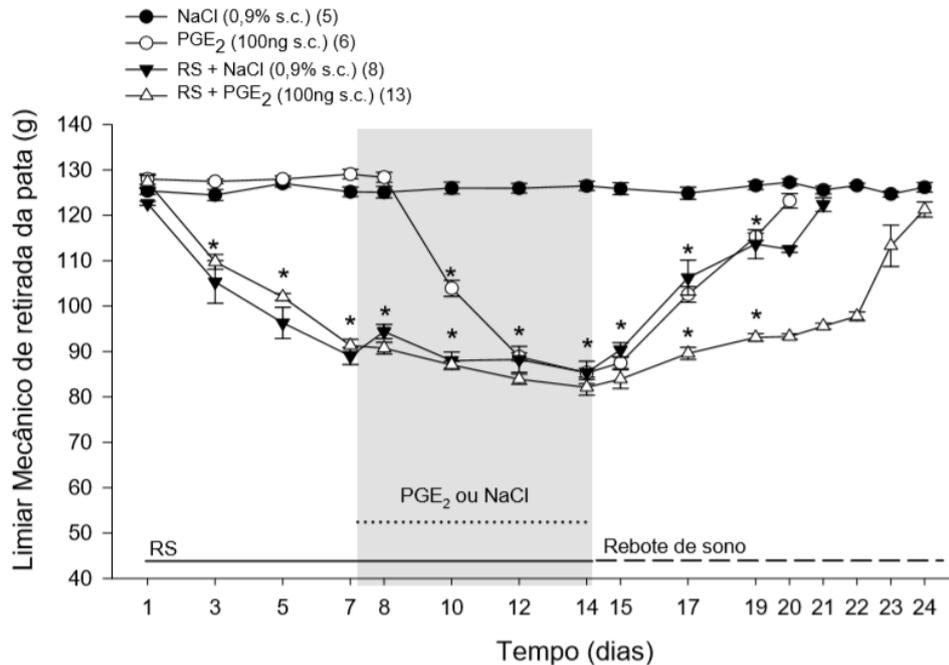


Gráfico 1A – Efeito pró-nociceptivo induzido pela associação entre 14 dias de RS e injeções diárias de PGE₂ durante os 7 dias finais. A associação entre restrição de sono (RS) e PGE₂ durante 7 dias não induz hiperalgesia crônica, embora tenha retardado o retorno ao limiar nociceptivo basal. O símbolo “*” indica redução significativa do limiar nociceptivo em comparação ao grupo que recebeu injeção salina (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

Fonte: Pescador e colaboradores, 2019.

Mas um dado surpreendente foi obtido a partir desses animais, quando eles retornaram ao limiar nociceptivo basal, administramos novamente PGE₂ e esses animais não respondem mais a novas injeções de PGE₂. Aparentemente eles se tornam resistentes ao desenvolvimento da hiperalgesia aguda e crônica, pois seu limiar nociceptivo não reduz mesmo após 14 dias de injeções de PGE₂ (o suficiente para induzir hiperalgesia crônica em animais controle) (Figura 1B).

1B

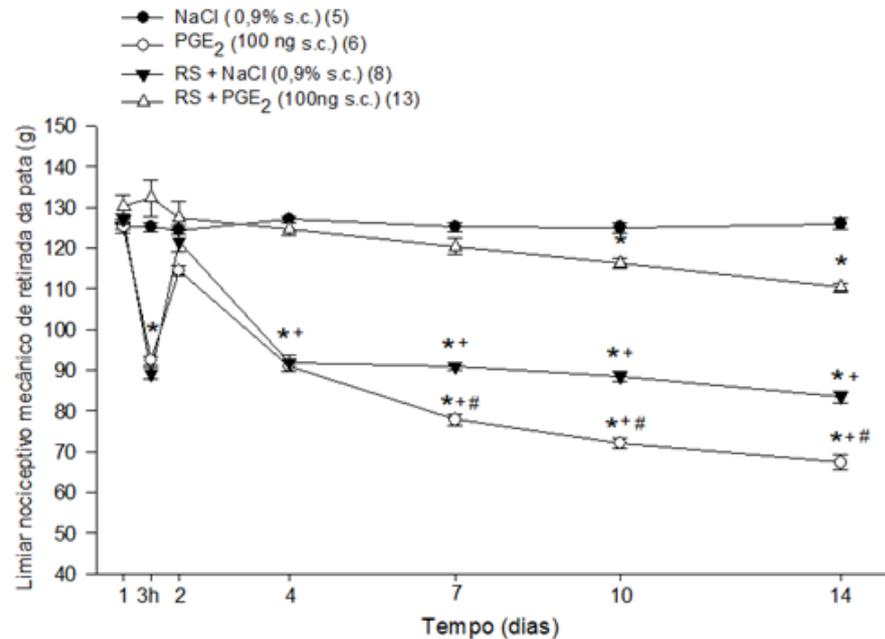


Gráfico 1B – Efeito persistente da PGE₂ em animais previamente expostos à RS durante 14 dias associada a injeções diárias de PGE₂ durante os últimos 7 dias. Assim que cada grupo retornou ao limiar basal após a associação de 14 dias de RS com 7 injeções diárias de PGE₂, as injeções diárias de PGE₂ foram reiniciadas e mantidas por um período de 14 dias. O símbolo “*” indica limiar nociceptivo significativamente menor quando comparado ao grupo NaCl (0,9% s.c.); o símbolo “+” indica limiar significativamente menor quando comparado ao grupo previamente exposto a RS + PGE₂ (100ng s.c.); o símbolo “#” indica limiar significativamente menor quando comparado ao grupo previamente exposto apenas a RS (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguidas pelo teste de Tukey p<0,05).

Fonte: Pescador e colaboradores, 2019.

Portanto, apesar das evidências de que a falta de sono aumenta a dor, esses dados (PESCADOR, 2019) sugerem que a restrição de sono *não facilita* o processo de cronificação da dor, e, paradoxalmente, que a associação entre restrição de sono e estimulação nociceptiva (PGE₂) induz um efeito protetor, *impedindo* a cronificação da dor por estímulos subsequentes.

Entretanto, os mecanismos fisiológicos pelos quais esse efeito protetor ocorre permanecem desconhecidos. Ao mesmo tempo, dados prévios do nosso laboratório sugerem que a atividade do sistema dopaminérgico mesolímbico é necessária, tanto

para a pró-nocicepção induzida pela restrição de sono (SARDI et al., 2018a; SARDI et al., 2018b), quanto para a cronificação da dor (VERGARA et al., 2020).

Considerando esses dados, poderia o sistema dopaminérgico mesolímbico estar envolvido nos processos neurofisiológicos responsáveis pelo efeito protetor observado?

Estes dados instigaram mais investigações para determinar quais os mecanismos potencialmente envolvidos nesse efeito protetor. Visto isso, o presente trabalho buscou explorar a relação do sistema dopaminérgico mesolímbico com o efeito protetor das injeções de PGE₂ associadas à RS.

1.1 JUSTIFICATIVA

Dados de estudos preliminares do nosso laboratório demonstraram um efeito protetor da exposição prévia a 14 dias de restrição parcial de sono associado à injeção de PGE₂ por 7 dias no desenvolvimento de dor crônica (PESCADOR, 2019). Além disso, achados anteriores do nosso laboratório sugerem que o sistema dopaminérgico mesolímbico medeia o efeito pró-nociceptivo da restrição de sono (SARDI et al., 2018a; SARDI et al., 2018b) e a transição da dor aguda para a crônica (VERGARA et al., 2020).

No presente trabalho, foi avaliado se o aumento da disponibilidade de dopamina facilita o desenvolvimento de respostas hiperalgésicas tardias e de dor crônica em animais previamente submetidos a 14 dias de restrição de sono e sete dias de injeções de PGE₂. É necessário ressaltar, no entanto, que a RS foi utilizada apenas como ferramenta para o entendimento da resistência à dor e não se sugere, a partir dos resultados obtidos, que a redução do tempo de sono seja usada para tratar ou prevenir a dor.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Testar o envolvimento da dopamina no efeito protetor sobre a dor induzido pela exposição prévia à restrição de sono associada a estimulação nociceptiva.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar se o aumento dos níveis sistêmicos ou intra-Núcleo Accumbens de dopamina afetam o efeito protetor induzido pela exposição prévia à restrição de sono associada a estimulação nociceptiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SONO

O sono é um fenômeno comum a uma grande variedade de grupos animais e é essencial para eventos neurobiológicos relacionados ao aprendizado, a consolidação da memória, a plasticidade e homeostase sináptica, além de contribuir para a eliminação de produtos do metabolismo celular e para a restauração da reserva energética de glicogênio do cérebro (FRANK e HELLER 2019). Para além do sistema nervoso, o sono é necessário à homeostase do sistema imune e endócrino, que sofrem influência do ciclo circadiano. O ciclo circadiano, em conjunto com a duração do período de vigília, determina o início, a profundidade e a duração do sono (BROWN et al., 2012).

No entanto, a insuficiência de sono na sociedade contemporânea tem se apresentado um problema de prevalência crescente, em especial entre jovens e adolescentes em idade escolar (OWENS et al., 2014) e trabalhadores que atuam em turnos noturnos ou rotativos (KECKLUND e AXELSSON, 2016). Apesar da média recomendada de 7 a 8h de sono por noite ser suficiente para a maioria da população adulta, a quantidade de sono necessária para a manutenção da qualidade de vida varia de indivíduo para indivíduo (FERRARA e DE GENNARO, 2001) e a privação ou insuficiência de sono podem ser resultado de fatores socioambientais ou de condições de saúde pré-existentes (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2019). Mesmo assim, 35,2% da população adulta dos Estados Unidos relata dormir menos de 7h por dia (CDC, 2017). No Brasil, de acordo com dados do Instituto do Sono (EPISONO), estima-se que cerca de 108 milhões de brasileiros sofrem com distúrbios de sono (HIROTSU et al., 2014). Algumas patologias associadas à deficiência de sono são: apneia do sono, síndrome das pernas inquietas e insônia, sendo a última o distúrbio de sono mais comum, com prevalência mundial de 30-35% da população apresentando algum sintoma (BACELAR et al., 2019).

A insuficiência de sono causa prejuízos cognitivos e psicomotores globais, em particular nas funções de atenção, memória, regulação do humor e outros processos gerenciados pelo córtex pré-frontal e regiões parietais (KILLGORE, 2010). Além de

custos a curto prazo, a perda de sono crônica aumenta o risco de mortalidade (GRANDNER et al., 2010) e é fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças, dentre elas doenças cardiovasculares (ALTMAN et al., 2012), diabetes tipo 2 (LARCHER et al., 2015) e demência (SHI et al., 2017).

2.2 DOR

A dor é tradicionalmente definida, segundo a IASP, como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial” que desempenha a função de alertar e atrair a atenção para a lesão, motivando tratamento ou fuga (BASBAUM e JESSELL, 2014). Nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 61,2 bilhões de dólares são gastos todo ano devido à redução da produtividade e da força de trabalho relacionada a quadros de dor, como dor de cabeça, artrite e dor lombar (STEWART et al., 2003). Ainda, dores lombares, dores musculares de ombro e pescoço, fibromialgia e osteoartrite são as maiores causas de emissões de atestado médico e benefícios por incapacidade (BRAGE et al., 2010).

A percepção inicial de um estímulo nocivo ocorre pela ativação de fibras somatossensoriais específicas, denominadas nociceptores, que correspondem aos neurônios A δ e C. Esses neurônios aferentes primários transmitem o sinal nociceptivo para neurônios do corno dorsal da medula espinhal por meio da liberação de glutamato (BASBAUM e JESSELL, 2014). A informação nociceptiva é então transmitida da medula para regiões supraespinhais por vias ascendentes (D’MELLO e DICKENSON, 2008). A sensibilização para a dor, ou hiperalgesia, é um processo de adaptação do sistema nervoso frente a estímulos dolorosos repetidos por meio de mecanismos centrais e periféricos. Como mecanismo central, o sistema descendente de modulação da dor PAG-RVM é o mais notório. Sabe-se desde 1969, a partir do trabalho de Reynolds onde o estímulo elétrico da Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) no mesencéfalo induziu analgesia profunda em ratos, que a PAG representa um importante componente da modulação da dor à nível central (REYNOLDS, 1969). A indução de analgesia pela PAG é mediada por suas projeções descendentes à Medula Rostroventral (RVM) e pelas projeções desta para o corno dorsal da medula espinhal por meio de populações de neurônios, podendo

tanto inibir quanto facilitar a sinalização nociceptiva (LOYD e MURPHY, 2009). É amplamente reconhecido que esse circuito utiliza de vias opioidérgicas e que a ação antinociceptiva da morfina depende do sistema PAG-RVM (LANE, PATEL e MORGAN, 2005). Por sua vez, o efeito antinociceptivo da estimulação de receptores μ -opioides da PAG depende da ativação do sistema dopaminérgico, mediada por receptores de dopamina D₁ e D₂ (TOBALDINI et al., 2017). A PAG recebe projeções da amígdala, que por sua vez adquire sinais do córtex pré-frontal, relação que é sugerida como fonte da modulação emocional e afetiva da dor. A interação entre o ACC e a PAG por meio de vias opioidérgicas também participa do efeito analgésico induzido tanto por opióides quanto por placebo (influência do processamento consciente da dor) (OSSIPOV, DUSSOR e PORRECA, 2010). Modelos comportamentais de dor em animais são importantes ferramentas para o entendimento dos mecanismos neurais de processamento e modulação da dor em humanos. Se tratando de um fenômeno subjetivo, a experiência afetiva da dor não pode ser aferida em animais. No entanto, a atividade nociceptiva pode ser avaliada a partir de medidas de reflexo ou espontâneas frente a um estímulo doloroso (MOGIL, 2009).

2.3 CRONIFICAÇÃO DA DOR

De acordo com a *International Association for the Study of Pain* (IASP), quando a dor se estende por mais de três meses, estando presente na maioria dos dias, é descrita clinicamente como dor crônica (TREEDE, 2019). A dor crônica pode ser dividida em quatro estágios: (1) fator de risco que predisponha ao desenvolvimento de dor crônica; (2) lesão; (3) transição; e (4) estado crônico estável (APKARIAN e RECKZIEGEL, 2018). Assim, a presença de um fator de risco, associada à uma lesão, gera um estado de dor aguda que passa por um processo de transição para o estabelecimento de uma condição de dor crônica (APKARIAN e RECKZIEGEL, 2018). O tratamento de dores crônicas é um desafio, visto que medicamentos comumente utilizados para o tratamento de dor aguda, como opióides, antiinflamatórios não esteroidais (AINES) e acetaminofeno (paracetamol) são ineficazes para esse tipo de condição (KREBS et al., 2018). Além disso, o componente emocional da dor aparenta ter um papel mais importante na experiência

da dor crônica do que mecanismos nociceptivos, o que é sustentado pela relação entre a dor crônica e o sistema córtico-límbico, envolvendo o ACC, a ínsula, o NAc, a amígdala e o hipocampo. Essas regiões, relacionadas ao aprendizado e processamento emocional, interagem com o córtex pré-frontal medial e lateral e alteram a atividade cortical focada na percepção nociceptiva para algo mais próximo de um estado de sofrimento emocional (MANSOUR et al., 2014). Em um estudo com pacientes com dor crônica encontrou diferenças no padrão de sinalização do NAc, que também está relacionado a mecanismos de motivação e de recompensa, quando comparados com indivíduos saudáveis. Em pacientes com dor crônica, a atividade do NAc foi correlacionada a uma predição de piora da dor em resposta ao estímulo nocivo, enquanto em participantes saudáveis essa atividade era relacionada a uma predição de alívio (BALIKI et al., 2010).

O desenvolvimento de dor crônica, bem como sua presença enquanto condição estável, está intimamente relacionado com a atividade da dopamina no sistema mesolímbico. No entanto, essa relação apresenta caráter duplo: em indivíduos saudáveis, um estímulo nocivo induz a liberação de dopamina como mecanismo motivador e de recompensa, mas em indivíduos com dor crônica, observa-se uma redução dos níveis de dopamina (TAYLOR et al., 2016). Ademais, a transição da dor aguda para dor crônica parece depender de uma atividade dopaminérgica exacerbada no NAc, visto que o bloqueio de receptores D₂ no núcleo abole a cronificação da dor em ratos (DIAS et al., 2015). Contudo, os mecanismos responsáveis pela associação entre a dopamina e cronificação da dor e o estado de dor crônica permanecem desconhecidos.

2.4 RELAÇÃO ENTRE DOR E SONO

Tanto a dor quanto o sono são essenciais para a sobrevivência e manutenção da saúde humana e problemas no funcionamento de sistemas que os regulam causam prejuízos significativos à saúde e à qualidade de vida. Tanto distúrbios de sono quanto a dor crônica são comorbidades em comum em doenças como diabetes tipo 2, depressão e obesidade (FINAN et al., 2013) e 90% dos pacientes com fibromialgia apresentam algum tipo de distúrbio de sono (KESKINDAG e KARAAZIZ, 2017).

De fato, a literatura aponta para uma relação bidirecional entre a dor e o sono, onde a privação de sono atua exacerbando a dor enquanto quadros de dor contribuem para a instabilidade ou redução do tempo de sono (HERRERO BABILLONI et al., 2019)

Mecanismos de modulação endógena da dor, quando deficientes, levam à redução da atividade inibitória da dor ou ao aumento da facilitação da dor (HERRERO BABILLONI et al., 2019). O sono insuficiente é um fator que predispõe para anormalidades no funcionamento desses mecanismos, visto que a disfunção dos sistemas de inibição da dor é mais prevalente em indivíduos com insônia do que em indivíduos sem distúrbios de sono (HAACK et al., 2012). Além disso, diversas regiões do cérebro que participam de mecanismos de modulação da dor também atuam na regulação do ciclo de sono e vigília, dentre elas a Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) e o Núcleo Accumbens (NAc) (ZHANG et al., 2013; OSIPOV, MORIMURA e PORRECA, 2014; HARRIS e PENG, 2019).

Já foi demonstrado que tanto a atividade da PAG, quanto do Bulbo Rostroventral (RVM) são necessárias para a geração do efeito pró-nociceptivo da restrição de sono, visto que a indução de dano à PAG ou à RVM em animais com restrição crônica de sono abole a redução do limiar nociceptivo (SARDI et al., 2018).

A participação da dopamina tanto em mecanismos de modulação da dor quanto de regulação do sono sugere uma relação entre os dois processos. Essa hipótese é reforçada pela constatação de que o efeito pró-nociceptivo da privação de sono REM depende da redução da atividade de receptores D_2 associada ao aumento da atividade de receptores adenosinérgicos A_{2A} no NAc (SARDI et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os animais utilizados foram ratos machos da linhagem *Wistar* pesando entre 270 g e 300 g. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Paraná e foram mantidos em gaiolas plásticas com maravalha em ciclo 12h/12h claro e escuro, com temperatura ambiente de 22°C ± 2 e providos de água e comida *ad libitum*. Os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Paraná (CEUA 1279). Foi utilizado o mínimo de animais, apenas o necessário para permitir as análises estatísticas (aproximadamente 8 por grupo).

3.2 DROGAS

Prostaglandina E₂ (PGE₂, 100 ng / 30 µL) (DIAS et al., 2015; FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990); GBR 12909, 1-(2-[bis(4-fluorofenil)metoxi]etil)-4-(3-fenilpropil) dicloridrato de piperazina, inibidor seletivo da recaptação de dopamina (0,5 nmol / 0,25 µL) (DIAS et al., 2015). Adquiridas da Sigma-Aldrich e diluídas em NaCl 0,9%. Prolopa (37,5 mg / kg) (composição: L-dopa 200 mg + cloridrato de benserazida 57 mg) (dispersível, Hoffman-LaRoche, Brasil) (PADOVAN-NETO et al., 2015). Diluídas em NaCl 0,9%.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA CRÔNICA

O modelo de hiperalgesia inflamatória crônica proposto por Ferreira, Lorenzetti e De Campos (1993) preconiza que ratos que recebem injeções subcutâneas diárias de prostaglandina E₂ (PGE₂) (100ng/30µL por pata) por 14 dias passam a apresentar hiperalgesia que persiste por pelo menos 30 dias após o término das injeções. O período de 14 dias de injeção de PGE₂ na face dorsal da pata traseira dos animais é definido como o período de indução; e o período posterior aos 14 dias, onde o limiar nociceptivo inferior ao basal ainda pode ser

observado por no mínimo 30 dias mesmo sem intervenções adicionais, é definido como período de manutenção (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990).

No entanto, a associação de procedimentos que dificultam a cronificação da dor com esse modelo impede a continuação do estado de hiperalgesia após a descontinuação das injeções de PGE₂. Em contrapartida, a realização de intervenções facilitadoras da cronificação da dor resulta no estado de hiperalgesia crônica com apenas 7 dias de injeções de PGE₂ (DIAS et al., 2015; VERGARA et al., 2020).

A determinação no limiar nociceptivo mecânico ao longo dos experimentos foi utilizada como medida da hiperalgesia induzida por PGE₂. Antes de cada injeção de PGE₂, a medida do limiar nociceptivo mecânico foi realizada por meio do teste de Randall-Selitto (RANDALL; SELITTO, 1957). No teste, um peso, em gramas, crescente é aplicado à face dorsal da pata traseira do animal (a mesma onde serão aplicadas as injeções) e no momento que o animal exibir comportamento de retirada da pata, o peso é registrado por um analgesímetro mecânico digital (Insight, Brasil). O valor quantitativo do limiar nociceptivo mecânico de cada animal foi determinado a partir da média de duas a três medidas realizadas.

3.4 RESTRIÇÃO DE SONO

A restrição de sono total (RS) foi realizada pelo método *Gentle Handling* enriquecido (ALEXANDRE et al., 2017; SARDI et al., 2018a), que consiste na aplicação de estímulos gentis e introdução de objetos novos na gaiola, estimulando o comportamento exploratório dos animais e impedindo que durmam. Os estímulos gentis incluem mudança de posição ou movimentação cuidadosa da gaiola, toque nos pelos dos animais com pincel de cerdas macias, abertura da gaiola, entre outros. Os grupos que não foram submetidos à restrição de sono ficaram no mesmo ambiente que os demais e sob as mesmas condições, no entanto ficaram livres para dormir.

3.5 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA CANULAÇÃO INTRA-NAC

Sob anestesia geral induzida por xilazina (10 mg/kg i.p.) e ketamina (60 mg/kg i.p.), o animal é posicionado no aparelho estereotáxico e uma cânula guia de aço inoxidável e calibre 25 é fixada, com resina acrílica, segundo o plano estereotáxico de forma que sua extremidade inferior fique a 2 mm acima do sítio de interesse. A coordenada a ser seguida para administração intra-NAc core foi de: +1,30 no sentido rostro-caudal; -6,20 dorso-ventral e $\pm 1,80$ mm lateral, a partir de bregma (PAXINOS; WATSON, 2007). Terminada a cirurgia os animais receberam dipirona (30 mg/kg i.m.) e gentamicina (0.5 mg/kg s.c.) e os experimentos foram realizados sete dias após a implantação das cânulas.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Para determinar se houve prejuízo à atividade locomotora dos animais em decorrência dos experimentos, que possa comprometer a confiabilidade dos resultados, foi realizado teste de campo aberto ao final de cada experimento. O teste de campo aberto foi realizado por meio de uma arena circular (de 1 m de diâmetro e com 16 quadrantes). O animal é colocado no centro da arena e é realizada a contagem de quadrantes (Q) percorridos e número de levantadas (L) de cada animal individualmente no tempo de cinco minutos. Considera-se um quadrante percorrido quando as quatro patas do animal atravessam a linha que separa um quadrante do outro e o comportamento de levantada é verificado quando o animal se apoia somente nas duas patas traseiras.

3.7 ANÁLISE DE DADOS

Os dados comportamentais foram avaliados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey. Como medidas dependentes temos o comportamento nociceptivo (tempo), e como medidas independentes os diferentes tratamentos e a condição de sono. O nível de significância adotado foi de igual ou menor a 0,05. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Para realização dos cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa Sigma Plot.

3.8 DESENHO EXPERIMENTAL

Para determinar se o aumento da atividade dopaminérgica, após o período de associação entre restrição de sono e estimulação nociceptiva, abole o efeito protetor, foram conduzidos os experimentos descritos abaixo:

a. Determinar se o aumento dos níveis sistêmicos de dopamina durante o período de retorno ao limiar nociceptivo basal previne o efeito protetor sobre a dor aguda e crônica que foi previamente induzido pela associação entre restrição de sono (RS) e injeções diárias de PGE₂.

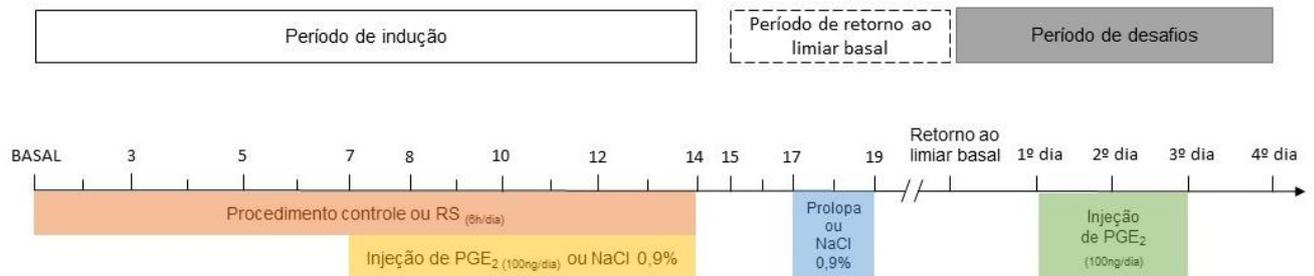


Figura 1 - Planejamento e disposição temporal do experimento “a”. 5 grupos foram submetidos a RS ou Procedimento controle por 6 horas diárias (das 7 às 13 h) durante 14 dias, sendo que nos últimos 7 dias (do 8º ao 14º dia) uma injeção (30 µl) diária de salina ou PGE₂ (100 ng s.c.) foi administrada na pata traseira. Ao final desse período, foi realizada administração oral diária de salina ou Prolopa, um precursor da dopamina (37,5 mg / kg) (PADOVAN-NETO et al., 2015), do 17º ao 19º dia por três dias. No momento em que cada grupo retornou ao limiar nociceptivo basal iniciou-se um novo ciclo de injeções diárias de PGE₂. A resposta dos grupos que receberam Prolopa foi comparada àquela dos animais que receberam salina.

b. Determinar se o aumento da disponibilidade sináptica de dopamina no núcleo Accumbens, durante o período de retorno ao limiar nociceptivo basal, previne o efeito protetor sobre a dor aguda e crônica que foi previamente induzido pela associação entre RS e injeções diárias de PGE₂.

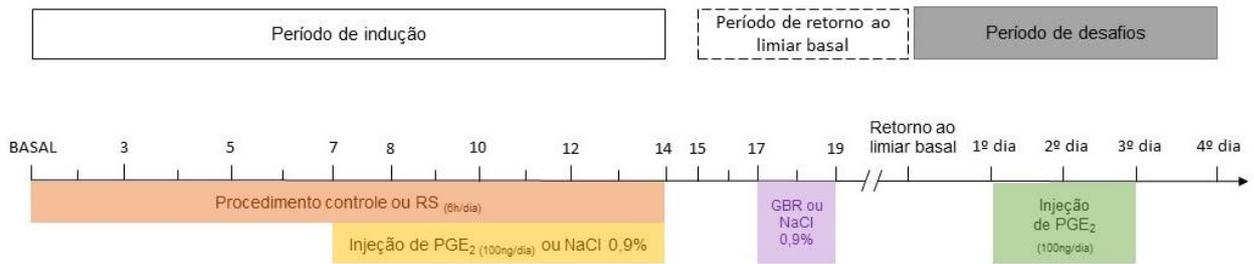


Figura 2 - Planejamento e disposição temporal do experimento “b”. 6 grupos foram submetidos a RS ou Procedimento controle por 6 horas diárias (das 7 às 13 h) durante 14 dias, sendo que nos últimos 7 dias (do 8º ao 14º dia) uma injeção (30 µl) diária de salina ou PGE₂ (100 ng) foi administrada na pata traseira. Ao final desse período, foi realizada uma microinjeção (0,25 µl) diária de veículo ou do GBR (inibidor seletivo da receptação de dopamina) (0,5 nmol (DIAS et al., 2015), do 17º ao 19ª dia) por três dias. No momento em que cada grupo retornou ao limiar nociceptivo basal iniciou-se um novo ciclo de injeções diárias de PGE₂. A resposta dos grupos que receberam GBR foi comparada àquela dos animais que receberam veículo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RETORNO AO LIMIAR BASAL: PROLOPA

Após a exposição a 14 dias de RS ou procedimento controle, associados a injeções de PGE₂ ou salina nos últimos sete dias, os animais foram deixados livres para dormir (período de sono rebote) e receberam salina ou Prolopa via oral. Nos grupos submetidos a RS e/ou injeção de PGE₂, o retorno ao limiar nociceptivo basal se deu de forma progressiva, mas diferente entre os grupos (Gráfico 2A). Nenhum dos grupos experimentais desenvolveu hiperalgesia crônica, a qual seria caracterizada segundo o modelo de Ferreira et al. (1993) por um estado de hiperalgesia com duração de, pelo menos, 30 dias após o término das injeções de PGE₂.

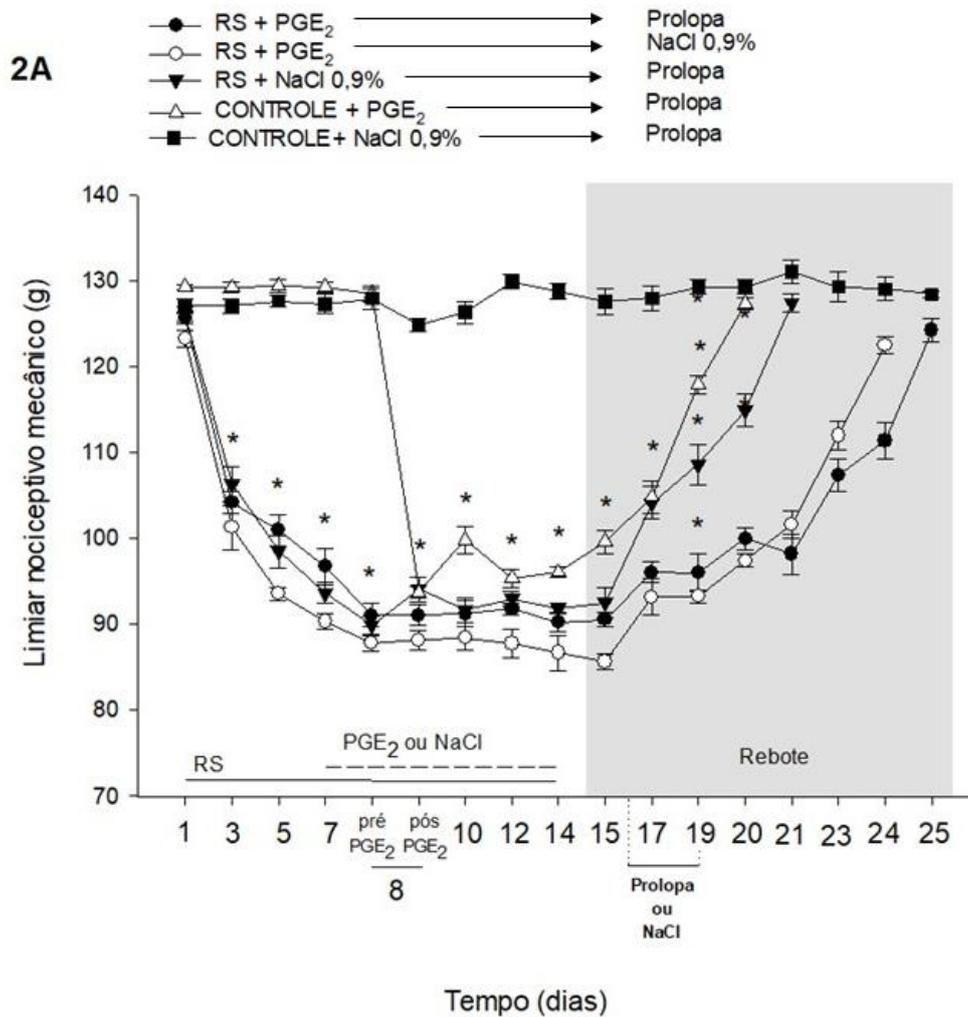


Gráfico 2A – Efeito pró-nociceptivo induzido pela associação entre 14 dias de RS e injeções diárias de PGE₂ durante os 7 dias finais em animais tratados com Prolopa ou salina durante o período de sono rebote (recuperação). Todos os grupos exceto os controles para PGE₂ (que receberam salina) sofreram indução de hiperalgisia entre o 7º e 14º dia de experimento e retornaram ao limiar basal no período de sono rebote. Durante esse período, receberam Prolopa via oral nos dias 16, 17 e 19. O símbolo “*” indica redução significativa do limiar nociceptivo em comparação ao grupo que recebeu injeção salina e não foi submetido a RS (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey, p<0,05). O “n” amostral utilizado foi de 6 a 8 animais por grupo.

4.2 O AUMENTO SISTÊMICO DE DOPAMINA PREVINE O EFEITO PROTETOR

Em concordância com dados obtidos anteriormente por nosso laboratório (Gráfico 1B) (PESCADOR, 2019), o grupo submetido a 14 dias de RS e 7 dias de injeção de PGE₂ não respondeu a novas injeções de PGE₂, tornando-se resistente ao desenvolvimento da hiperalgesia aguda e, conseqüentemente, crônica (Gráfico 3A). Esses dados confirmam nossas observações anteriores (PESCADOR, 2019) de que a associação prévia de RS e estimulação nociceptiva induz um efeito protetor, tornando os animais resistentes a novos estímulos nocivos.

Esse efeito protetor foi prevenido pela administração oral do precursor de dopamina, Prolopa (37,5 mg/kg) do 3^o ao 5^o dia de rebote de sono (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, $p < 0,001$). Os animais que receberam Prolopa responderam normalmente a PGE₂, apresentando resposta a novas injeções de PGE₂ comparável aos animais controle.

O mesmo pôde ser observado nos grupos que foram submetidos a apenas uma (RS ou PGE₂) ou nenhuma intervenção experimental e tratados com Prolopa (Gráfico 3A). Importante, no grupo RS + PGE₂ tratado com Prolopa, o limiar nociceptivo não retorna ao valor basal 24h após a segunda injeção de PGE₂, o que indica que o quadro de hiperalgesia crônica está se desenvolvendo (Gráfico 3A).

Esses dados mostram que o aumento da disponibilidade sistêmica de dopamina durante o período de retorno ao limiar basal (após a exposição) previne o efeito protetor sobre a dor induzido pela exposição prévia a RS e estimulação nociceptiva.

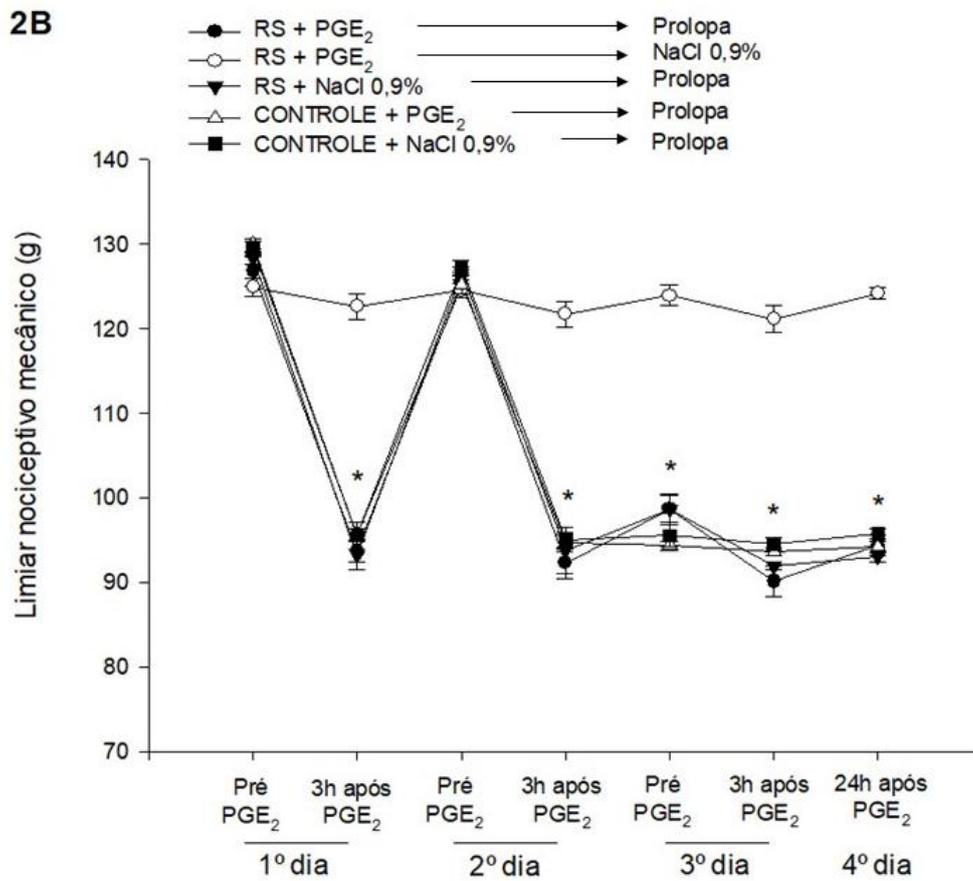


Gráfico 2B – Efeito da Prolopa administrada no período de rebote de sono sobre o desenvolvimento de hiperalgesia aguda induzida por 3 novas injeções de PGE₂ após retorno ao limiar basal. No dia seguinte ao retorno ao limiar basal de cada grupo, iniciou-se o período de novas injeções diárias de PGE₂ por 3 dias. O limiar nociceptivo de cada dia foi aferido diariamente, antes, 3h após e 24h após a 3ª injeção de PGE₂. O símbolo “*” indica redução significativa do limiar em relação ao grupo submetido a RS e injeções de PGE₂ e salina no período de rebote (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). O “n” amostral utilizado foi de 6 a 8 animais por grupo.

4.3 RETORNO AO LIMIAR BASAL: GBR

Após a exposição a 14 dias de RS ou procedimento controle, associados a injeções de PGE₂ ou salina nos últimos sete dias, os animais foram deixados livres para dormir (período de sono rebote) e receberam salina ou GBR 12909 intra-NaC. Nos grupos submetidos a RS e/ou injeção de PGE₂, o retorno ao limiar nociceptivo basal se deu de forma progressiva, mas diferente entre os grupos (Gráfico 3A). Nenhum dos grupos experimentais desenvolveu hiperalgesia crônica, a qual seria caracterizada segundo o modelo de Ferreira et al. (1993) por um estado de hiperalgesia com duração de, pelo menos, 30 dias após o término das injeções de PGE₂.

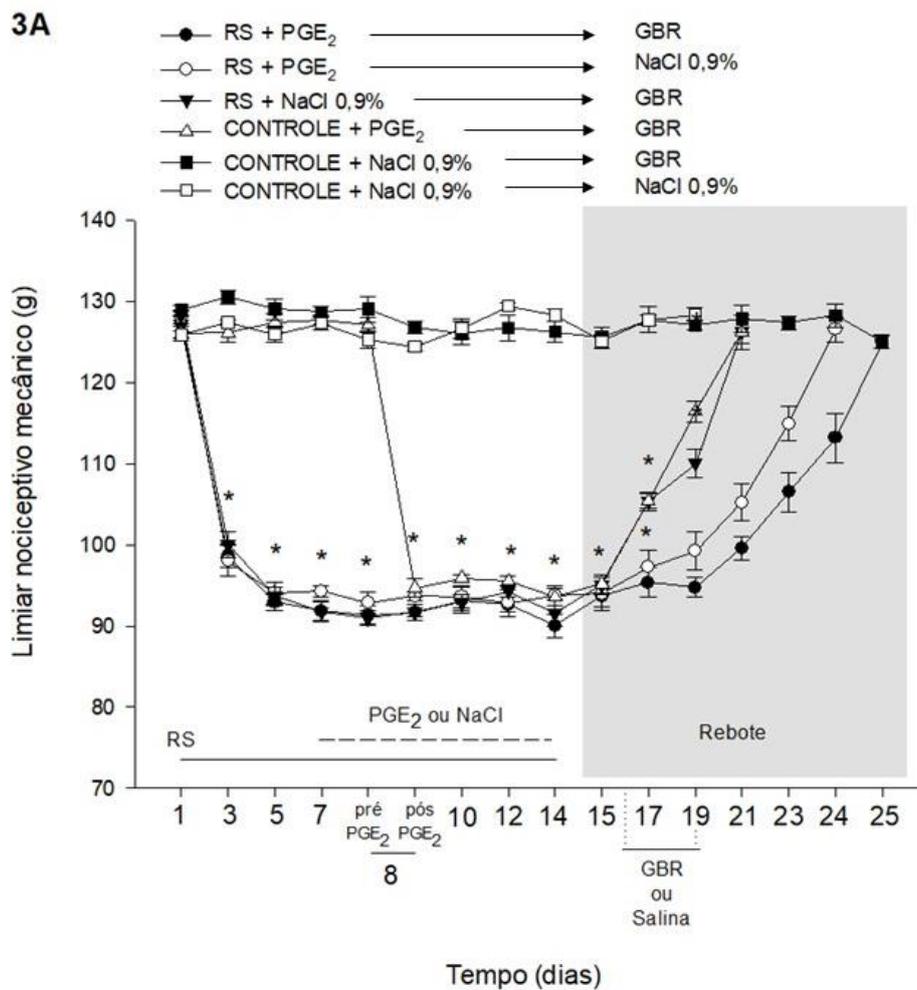


Gráfico 3A – Efeito pró-nociceptivo induzido pela associação entre 14 dias de RS e injeções diárias de PGE₂ durante os 7 dias finais em animais tratados com GBR ou salina do 2º

ao 5º dia de rebote de sono. Todos os grupos exceto os controles (salina + GBR e salina + salina) sofreram indução de hiperalgésia entre o 7º e 14º dia de experimento e retornaram ao limiar basal no período de rebote. O símbolo “**” indica redução significativa do limiar nociceptivo em comparação ao grupo que recebeu injeção salina e não foi submetido a RS (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). O “n” amostral utilizado foi de 4 a 8 animais por grupo.

4.4 O AUMENTO DA DISPONIBILIDADE DE DOPAMINA NO NÚCLEO ACCUMBENS PREVINE O EFEITO PROTETOR

Para determinar o envolvimento da dopamina mesolímbica no efeito protetor induzido pela exposição prévia a RS e estimulação nociceptiva, administramos, do 3º ao 5º dia de rebote de sono, o inibidor da receptação de dopamina GBR 12909 (0,5 nmol / 0,25 µL) no NAc, principal alvo das projeções dopaminérgicas mesolímbicas.

A administração intra-NAc de GBR durante o período de rebote de sono preveniu o efeito protetor da associação prévia de 14 dias de RS e 7 dias de PGE₂. Os grupos tratados com GBR responderam normalmente a PGE₂, apresentando resposta hiperalgésica semelhante aos grupos controle (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, $p < 0,001$) (Gráfico 3B). No grupo RS + PGE₂ tratado com GBR, o limiar nociceptivo não retorna ao valor basal 24h após a segunda injeção de PGE₂, o que indica que o quadro de hiperalgésia crônica está se desenvolvendo (Gráfico 3B).

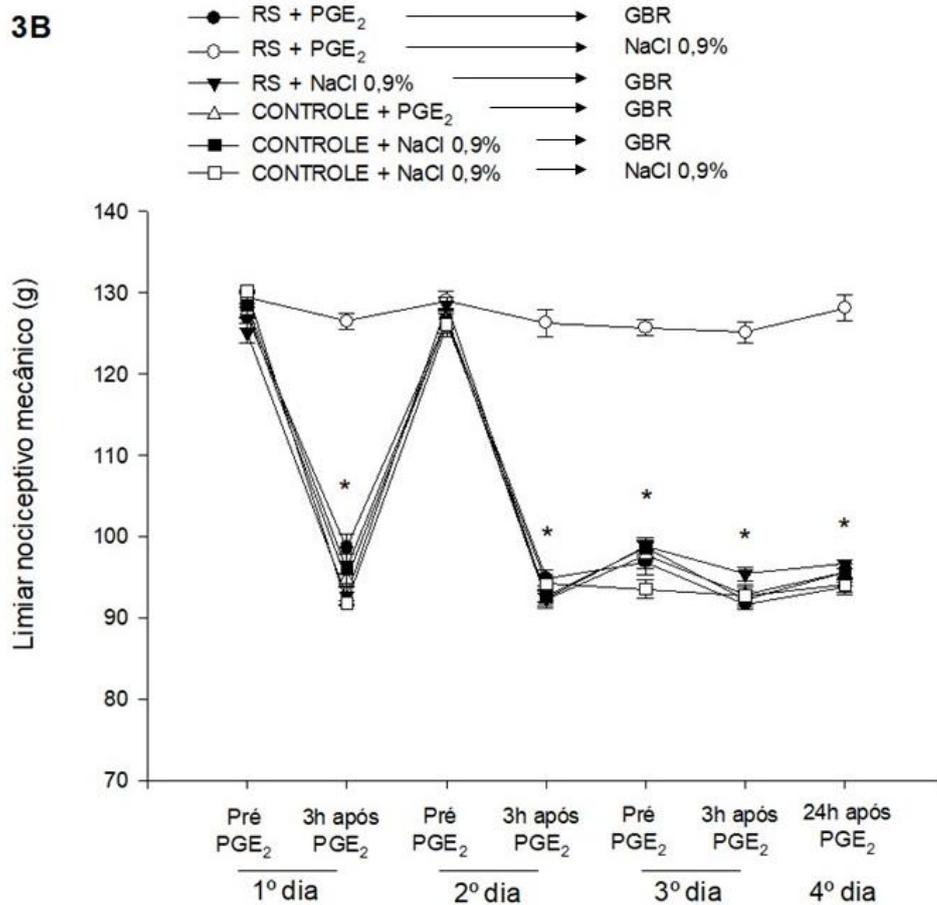


Gráfico 3B – Efeito do GBR administrado no período de rebote de sono sobre o desenvolvimento de hiperalgesia aguda induzida por 3 novas injeções de PGE₂ após retorno ao limiar basal. No dia seguinte ao retorno ao limiar basal de cada grupo, iniciou-se o período de novas injeções diárias de PGE₂ por 3 dias. O limiar nociceptivo foi aferido diariamente antes, 3h após e 24h após a 3ª injeção de PGE₂. O símbolo “*” indica redução significativa do limiar em relação ao grupo submetido a RS e injeções de PGE₂ e salina no período de rebote (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). O “n” amostral utilizado foi de 4 a 8 animais por grupo.

Os resultados até aqui apresentados sugerem que a associação da restrição de sono com a estimulação nociceptiva provavelmente induz uma plasticidade dopaminérgica que torna o animal resistente, posteriormente, ao desenvolvimento da dor. Uma possível explicação para esse fenômeno seria que a RS diminui a atividade dopaminérgica (VOLKOW et al., 2012; SARDI et al., 2018b) e que a transição da dor aguda para crônica depende da atividade da dopamina no sistema mesolímbico (VERGARA et al., 2020). Essa hipótese estaria de acordo com autores que propõem que a transição da dor aguda para a crônica envolve a reorganização

dos circuitos emocionais e motivadores do cérebro após estímulos nociceptivos (HASHMI et al., 2013; MANSOUR et al., 2014; THOMPSON et al., 2018). Logo, a RS, diminuindo a disponibilidade de dopamina, e a PGE₂, recrutando dopamina, estrariam induzindo mecanismos antagônicos de plasticidade dopaminérgica.

Dessa forma, o que o presente trabalho sugere é que, ao aumentar a disponibilidade de dopamina, esse processo de plasticidade é revertido, e isso estaria prevenindo o efeito protetor. Evidentemente, neste estudo, a RS foi utilizada apenas como ferramenta para o entendimento da resistência à dor e não se sugere, a partir dos resultados obtidos, que a redução do tempo de sono seja usada para tratar ou prevenir a dor.

4.5 CAMPO ABERTO: PROLOPA

Não foi detectada diferença significativa entre os grupos no teste de campo aberto. O resultado foi dado pela análise por ANOVA de duas vias com medidas repetidas ($p < 0,05$) dos comportamentos exploratórios dos animais. Os comportamentos exploratórios correspondem à soma do número de levantadas e quadrantes percorridos ao longo de 5 minutos no campo aberto.

No entanto, no grupo RS + Salina + Prolopa, foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) entre os resultados do campo aberto antes dos experimentos e após o tratamento com Prolopa. Como somente este grupo apresentou diferença, essa redução da atividade exploratória pode ser resultado da exposição a algum fator estressor durante os experimentos.

4A

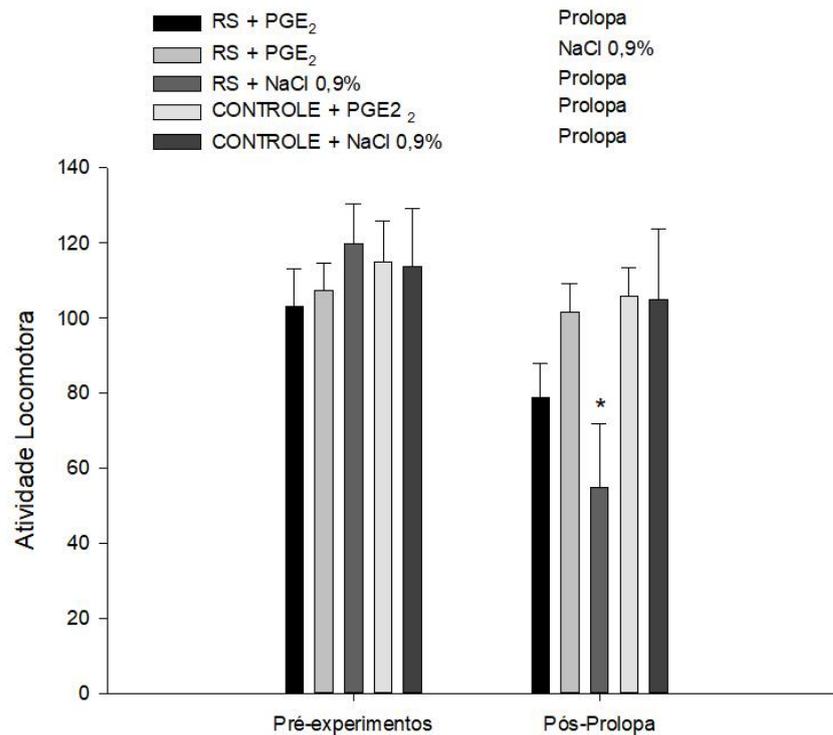


Gráfico 4A – Atividade locomotora antes e após tratamento com Prolopa administrado no período de rebote de sono. A atividade locomotora dos animais foi determinada antes e 24h após a administração de Prolopa ou NaCl. O símbolo “*” indica diferença significativa da atividade locomotora em relação ao período pré-experimentos (antes da administração de Prolopa) (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). O “n” amostral utilizado foi de 6 a 8 animais por grupo.

4.6 CAMPO ABERTO: GBR

Foi detectada uma diferença significativa dos grupos Controle + NaCl + GBR e Controle + PGE₂ + GBR em relação aos demais no teste de campo aberto. Essa diferença foi encontrada após o tratamento com GBR e corresponde a uma atividade locomotora reduzida em relação aos demais grupos (Gráfico 4B). O resultado foi dado pela análise por ANOVA de duas vias com medidas repetidas ($p < 0,05$) dos comportamentos exploratórios dos animais. Os comportamentos exploratórios correspondem à soma do número de levantadas e quadrantes percorridos ao longo de 5 minutos no campo aberto.

Além disso, nos grupos Controle + NaCl + GBR e Controle + PGE₂ + GBR, foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) entre os resultados do campo aberto antes dos experimentos e após o tratamento com GBR. Isso sugere que o GBR pode ter ocasionado um efeito inibidor da locomoção e que a RS inibe esse efeito (Gráfico 4B).

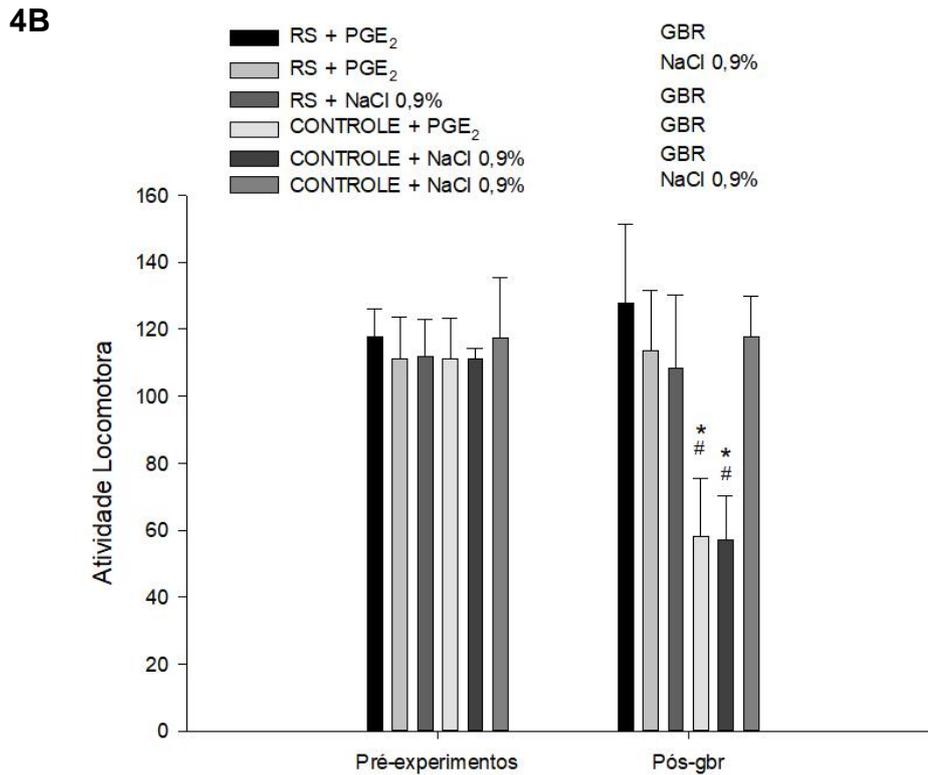


Gráfico 4B – Atividade locomotora antes e após tratamento com GBR administrado no período de rebote de sono. A atividade locomotora dos animais foi determinada antes e 24h após a administração de Prolopa ou NaCl. O símbolo “*” indica diferença significativa da atividade locomotora em relação ao período pré-experimentos (antes da administração de Prolopa). O símbolo “#” indica diferença significativa entre o grupo indicado e os demais, sob a mesma condição temporal (pós-GBR) (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$). O “n” amostral utilizado foi de 4 a 8 animais por grupo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo confirma dados anteriores (PESCADOR, 2019) de que a associação de RS e estimulação nociceptiva persistentes induzem um efeito protetor, tornando o animal resistente ao desenvolvimento posterior da dor aguda ou crônica. O achado principal desse estudo mostra que a dopamina está envolvida nesse efeito, uma vez que estratégias farmacológicas que induzem o aumento da dopamina, tanto sistêmica quanto mesolímbica previnem tal efeito. Portanto, esse efeito protetor provavelmente depende de alterações neuroplásticas no sistema dopaminérgico mesolímbico.

Considerando a alta prevalência de condições de dor crônica na população em geral (MILLS et al., 2019) e os ainda baixos índices de sucesso em seu tratamento farmacológico (KREBS et al., 2018), é imperativo investigar novas estratégias para o manejo clínico dessas condições. Esse estudo utilizou ferramentas de manipulação fisiológicas (RS) e farmacológicas para mostrar que um estado de resistência ao desenvolvimento da dor pode ser induzido. Não temos informações sobre nenhum estado semelhante relatado na literatura. Investigar as bases desse fenômeno pode resultar em avanços sem precedentes no tratamento da dor. Evidentemente, um dos próximos passos a partir desse estudo seria encontrar alguma manipulação fisiológica ou farmacológica que substitua a RS na indução desse efeito protetor. Uma vez que este estudo demonstrou o envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito protetor e que evidências apontam para uma redução da atividade dopaminérgica induzida pela restrição de sono (VOLKOW et al., 2012; SARDI et al., 2018b), é possível que o efeito protetor dependa da redução da atividade dopaminérgica. Portanto, nosso próximo passo será testar se o haloperidol, uma droga antipsicótica cujo principal mecanismo de ação depende do antagonismo sobre receptores D₂ de dopamina, é capaz de induzir o efeito protetor quando associado às injeções de PGE₂.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, C.; LATREMOLIERE, A.; FERREIRA, A.; et al. Decreased alertness due to sleep loss increases pain sensitivity in mice. **Nature Medicine**, v. 23, n. 6, p. 768–774, 2017. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.4329>>.

ALTMAN, N. G.; SCHOPFER, E.; JACKSON, N.; et al. Sleep Duration versus Sleep Insufficiency as Predictors of Cardiometabolic Health Outcomes. **Sleep Med.**, p. 22, 2012.

APKARIAN, A. V.; RECKZIEGEL, D. Peripheral and central viewpoints of chronic pain, and translational implications. **Neuroscience Letters**, v. 702, p. 3–5, 2019. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.040>>.

ARTNER, J.; CAKIR, B.; SPIEKERMANN, J. A.; et al. Prevalence of sleep deprivation in patients with chronic neck and back pain: A retrospective evaluation of 1016 patients. **Journal of Pain Research**, v. 6, p. 1–6, 2013.

BACELAR, A.; JR, L. R. P. **Insônia: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Difusão Editora, 2013.

BALIKI, M. N.; GEHA, P. Y.; FIELDS, H. L.; APKARIAN, A. V. Predicting Value of Pain and Analgesia: Nucleus Accumbens Response to Noxious Stimuli Changes in the Presence of Chronic Pain. **Neuron**, v. 66, n. 1, p. 149–160, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.002>>.

BANDYOPADHYAY, A.; SIGUA, N. L. What is sleep deprivation? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2019.

BRAGE, S.; IHLEBÆK, C.; NATVIG, B.; BRUUSGAARD, D. Musculoskeletal disorders as causes of sick leave and disability benefits. **Europe PMC**, v. 130, n. 23, p. 2369–2370, 2010. Disponível em: <<http://tidsskriftet.no/article/2049314>>. Acesso em: 20/3/2021.

BROWN, R. E.; BASHEER, R.; MCKENNA, J. T.; STRECKER, R. E.; MCCARLEY, R. W. Control of sleep and wakefulness. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 3, p.

1087–1187, 2012.

CARTER, G. T.; DUONG, V.; HO, S.; et al. Side effects of commonly prescribed analgesic medications. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 457–470, 2014.

CDC - Data and Statistics - Sleep and Sleep Disorders. Disponível em: <https://www.cdc.gov/sleep/data_statistics.html>. Acesso em: 20/3/2021.

CHEATLE, M. D.; FOSTER, S.; PINKETT, A.; et al. Assessing and Managing Sleep Disturbance in Patients with Chronic Pain. **Anesthesiology Clinics**, v. 34, n. 2, p. 379–393, 2016.

CHOY, E. H. S. The role of sleep in pain and fibromyalgia. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 9, p. 513–520, 2015. Nature Publishing Group.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 1–32, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400724>>. .

CREED, F. A review of the incidence and risk factors for fibromyalgia and chronic widespread pain in population-based studies. **Pain**, v. 161, n. 6, p. 1169–1176, 2020.

DIAS, E. V.; SARTORI, C. R.; MARIÃO, P. R.; et al. Nucleus accumbens dopaminergic neurotransmission switches its modulatory action in chronification of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Neuroscience**, v. 42, n. 7, p. 2380–2389, 2015. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26173870/>>. Acesso em: 11/3/2021.

D'MELLO, R. D.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

FERRARA, M.; DE GENNARO, L. How much sleep do we need? **Sleep Medicine Reviews**, 2001. W.B. Saunders Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12531052/>>. Acesso em: 20/3/2021.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; DE CAMPOS, D. I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**, v. 42, n. 3, p. 365–371, 1990.

No longer published by Elsevier.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 1227–1231, 1993. Wiley-Blackwell. Disponível em: </pmc/articles/PMC2175796/?report=abstract>. Acesso em: 13/3/2021.

FINAN, P. H.; SMITH, M. T. The comorbidity of insomnia, chronic pain, and depression: Dopamine as a putative mechanism. **Sleep Medicine Reviews**, v. 17, n. 3, p. 173–183, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smr.2012.03.003>. .

FRANK, M. G.; HELLER, H. C. The Function(s) of Sleep. **Handbook of Experimental Pharmacology**. v. 253, p.3–34, 2019. Springer New York LLC. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/164_2018_140>. Acesso em: 4/3/2021.

GRANDNER, M. A.; HALE, L.; MOORE, M.; PATEL, N. P. Mortality associated with short sleep duration: The evidence, the possible mechanisms, and the future. **Sleep Medicine Reviews**, jun. 2010. Sleep Med Rev. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19932976/>. Acesso em: 11/3/2021.

HAACK, M.; SCOTT-SUTHERLAND, J.; SANTANGELO, G.; et al. Pain Sensitivity and Modulation in Primary Insomnia. **European Journal of Pain**, v. 16, n. 4, p. 522–533, 2012.

HAACK, M.; SIMPSON, N.; SETHNA, N.; KAUR, S.; MULLINGTON, J. Sleep deficiency and chronic pain: potential underlying mechanisms and clinical implications. **Neuropsychopharmacology**, v. 45, n. 1, p. 205–216, 2019.

HARRIS, H.; PENG, Y. Evidence and explanation for the involvement of the nucleus accumbens in pain processing. **Neural Regeneration Research**, v. 15, n. 4, p. 597–605, 2020.

HASHMI, J. A.; BALIKI, M. N.; HUANG, L.; et al. Shape shifting pain: Chronification of back pain shifts brain representation from nociceptive to emotional circuits. **Brain**, v. 136, n. 9, p. 2751–2768, 2013.

HERRERO BABILONI, A.; DE KONINCK, B. P.; BEETZ, G.; et al. Sleep and pain:

recent insights, mechanisms, and future directions in the investigation of this relationship. **Journal of Neural Transmission**, v. 127, n. 4, p. 647–660, 2019.

HIROTSU, C.; BITTENCOURT, L.; GARBUIO, S.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. Sleep complaints in the Brazilian population : Impact of socioeconomic factors. **Sleep Science**, v. 7, n. 3, p. 135–142, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.slsci.2014.08.001>>.

BASBAUM, A. I.; JESSELL T. M. Dor. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. **Princípios de Neurociências**. 5ª edição. Porto Alegre: AMGH, 2014. p. 462-467

KECKLUND, G.; AXELSSON, J. Health consequences of shift work and insufficient sleep. **BMJ (Online)**, v. 355, p. 1–13, 2016.

KESKINDAG, B.; KARAAZIZ, M. The association between pain and sleep in fibromyalgia. **Saudi Medical Journal**, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5447206/#ref3>>. Acesso em: 6/3/2021.

KILLGORE, W. D. S. Effects of sleep deprivation on cognition. **Progress in Brain Research**. v. 185, p.105–129, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21075236/>>. Acesso em: 11/3/2021.

KIM, S. H.; LEE, D. H.; YOON, K. B.; AN, J. R.; YOON, D. M. Factors associated with increased risk for clinical insomnia in patients with chronic neck pain. **Pain Physician**, v. 18, n. 6, p. 593–598, 2015.

KRAUSE, A. J.; PRATHER, A. A.; WAGER, T. D.; et al. The pain of sleep loss : A brain characterization in humans The pain of sleep loss : A brain characterization in humans . Authors Number of Figures : 5 ; Number of Tables : 1 Word Counts : Abstract : 231 ; Introduction : 662 ; Discussion : 1424 Competing . , 2019.

KREBS, E. E.; GRAVELY, A.; NUGENT, S.; et al. Effect of opioid vs nonopioid medications on pain-related function in patients with chronic back pain or hip or knee osteoarthritis pain the SPACE randomized clinical trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 319, n. 9, p. 872–882, 2018. American Medical Association. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/>>. Acesso em: 11/3/2021.

LANE, D. A.; PATEL, P. A.; MORGAN, M. M. Evidence for an intrinsic mechanism of antinociceptive tolerance within the ventrolateral periaqueductal gray of rats. **Neuroscience**, v. 135, n. 1, p. 227–234, 2005. Pergamon.

LARCHER, S.; BENHAMOU, P. Y.; PÉPIN, J. L.; BOREL, A. L. Sleep habits and diabetes. **Diabetes and Metabolism**, 1. set. 2015. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25623152/>>. Acesso em: 11/3/2021.

LOYD, D. R.; MURPHY, A. Z. The role of the periaqueductal gray in the modulation of pain in males and females: Are the anatomy and physiology really that different? **Neural Plasticity**, 2009. Hindawi Publishing Corporation. Disponível em: <</pmc/articles/PMC2633449/>>. Acesso em: 10/3/2021.

MACHADO, A. B. M.; HAERTEL, L. M. Áreas encefálicas relacionadas com as emoções. Sistema límbico. In: MACHADO, A. B. M.; HAERTEL, L. M. (3ª Ed.). **Neuroanatomia funcional**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. p. 261-268.

MANSOUR, A. R.; FARMER, M. A.; BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. Chronic pain: The role of learning and brain plasticity. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 129–139, 2014.

MILLS, S. E. E.; NICOLSON, K. P.; SMITH, B. H. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. **British Journal of Anaesthesia**, v. 123, n. 2, p. e273–e283, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>>. .

MOGIL, J. S. Animal models of pain: Progress and challenges. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 283–294, 2009.

MORIN, C. M.; BOOTZIN, R. R.; BUYSSE, D. J.; et al. Psychological and behavioral treatment of insomnia: update of the recent evidence (1998-2004). **Sleep**, v. 29, n. 11, p. 1398–414, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/sleep/article-lookup/doi/10.1093/sleep/29.11.1398>>.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Review series Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 2010.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and

chronification of pain. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 8, n. 2, p. 143–151, 2014.

OWENS, J.; AU, R.; CARSKADON, M.; et al. Insufficient sleep in adolescents and young adults: An update on causes and consequences. **Pediatrics**, v. 134, n. 3, p. e921–e932, 2014. American Academy of Pediatrics. Disponível em: <www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-1696>. Acesso em: 4/3/2021.

PADOVAN-NETO, F. E.; CAVALCANTI-KIWIATKOVISKI, R.; CAROLINO, R. O. G.; ANSELMO-FRANCI, J.; DEL BEL, E. Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of I-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. **Neuropharmacology**, v. 89, p. 87–99, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.08.019>>.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. [S. l.]: **New York: Academic Press**, 2007.

PESCADOR, A. C. Impacto da restrição de sono sobre o processo de cronificação da dor em ratos. Monografia de graduação (Bacharel em Biomedicina) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; et al. Hyperalgesia and Sensitization. , 2001. **Sinauer Associates**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10999/>>. Acesso em: 19/11/2021.

RANDALL, L. O., SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn Ther**. 1957

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, n. 3878, p. 444–445, 1969. American Association for the Advancement of Science. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/164/3878/444>>. Acesso em: 10/3/2021.

SARDI, NATALIA F.; LAZZARIM, M. K.; GUILHEN, V. A.; et al. Chronic sleep restriction increases pain sensitivity over time in a periaqueductal gray and nucleus accumbens dependent manner. **Neuropharmacology**, v. 139, p. 52–60, 2018.

SARDI, NATALIA FANTIN; TOBALDINI, G.; MORAIS, R. N.; FISCHER, L. Nucleus accumbens mediates the pronociceptive effect of sleep deprivation: The role of adenosine A_{2A} and dopamine D₂ receptors. **Pain**, v. 159, n. 1, p. 75–84, 2018.

SERAFINI, R. A.; PRYCE, K. D.; ZACHARIOU, V. The Mesolimbic Dopamine System in Chronic Pain and Associated Affective Comorbidities. **Biological Psychiatry**, v. 87, n. 1, p. 64–73, 2020.

SHI, L.; CHEN, S. J.; MA, M. Y.; et al. Sleep disturbances increase the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. **Sleep Medicine Reviews**, 1. ago. 2018. W.B. Saunders Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28890168/>>. Acesso em: 11/3/2021.

STEWART, W. F.; RICCI, J. A.; CHEE, E.; MORGANSTEIN, D.; LIPTON, R. Lost Productive Time and Cost Due to Common Pain Conditions in the US Workforce. **Journal of the American Medical Association**, v. 290, n. 18, p. 2443–2454, 2003. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/>>. Acesso em: 3/3/2021.

TAYLOR, A. M. W.; BECKER, S.; SCHWEINHARDT, P.; CAHILL, C. Mesolimbic dopamine signaling in acute and chronic pain: Implications for motivation, analgesia, and addiction. **Pain**, v. 157, n. 6, p. 1194–1198, 2016.

TAYLOR, D. J.; MALLORY, L. J.; LICHSTEIN, K. L.; et al. Comorbidity of chronic insomnia with medical problems. **Sleep**, v. 30, n. 2, p. 213–218, 2007.

THOMPSON, J. M.; NEUGEBAUER, V. Cortico-limbic pain mechanisms. **Neuroscience Letters**, v. 702, n. xxxx, p. 15–23, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.037>>. .

TOBALDINI, G.; REIS, R. A.; SARDI, N. F.; et al. Dopaminergic mechanisms in periaqueductal gray-mediated antinociception. , p. 1–9, 2017.

TOMIM, D. H.; PONTAROLLA, F. M.; BERTOLINI, J. F.; et al. The Pronociceptive Effect of Paradoxical Sleep Deprivation in Rats: Evidence for a Role of Descending Pain Modulation Mechanisms. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1706–1717, 2016.

TREEDE, R.-D.; RIEF, W.; BARKE, A.; et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of

Diseases (ICD-11). **Pain**, v. 160, n. 1, p. 19–27, 2019. Lippincott Williams and Wilkins. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00006396-201901000-00003>>. Acesso em: 20/3/2021.

VERGARA, F.; SARDI, N. F.; PESCADOR, A. C.; et al. Contribution of mesolimbic dopamine and kappa opioid systems to the transition from acute to chronic pain. **Neuropharmacology**, v. 178, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32771527/>>. Acesso em: 13/3/2021.

VOLKOW, N. D.; TOMASI, D.; WANG, G. J.; et al. Evidence that sleep deprivation down regulates dopamine D2R in ventral striatum in the human brain. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 19, p. 6711–6717, 2012.

ZHANG, J.-P.; XU, Q.; YUAN, X.-S.; et al. Projections of nucleus accumbens adenosine A2A receptor neurons in the mouse brain and their implications in mediating sleep-wake regulation. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 7, n. December, p. 1–15, 2013.