

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA PESCADOR

**IMPACTO DA RESTRIÇÃO DE SONO SOBRE O PROCESSO DE CRONIFICAÇÃO
DA DOR EM RATOS**

CURITIBA

2019

ANA CAROLINA PESCADOR

**IMPACTO DA RESTRIÇÃO DE SONO SOBRE O PROCESSO DE CRONIFICAÇÃO
DA DOR EM RATOS**

Trabalho de conclusão de curso 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: Prof^ª. Dra. Luana Fischer

CURITIBA

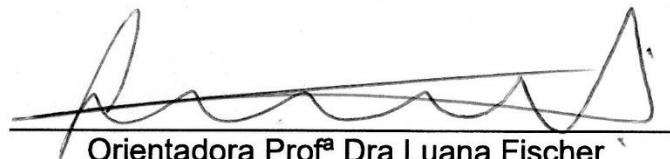
2019

TERMO DE APROVAÇÃO

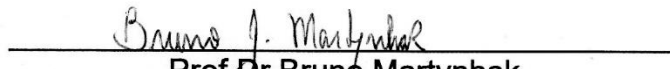
ANA CAROLINA PESCADOR

IMPACTO DA RESTRIÇÃO DE SONO SOBRE O PROCESSO DE CRONIFICAÇÃO DA DOR EM RATOS

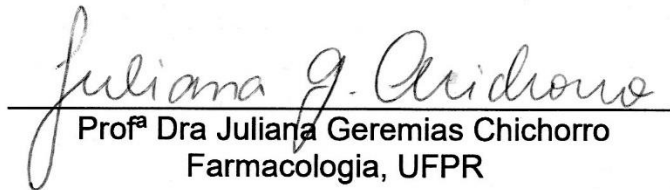
TCC II apresentado ao curso de graduação em biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em biomedicina.



Orientadora Profª Dra Luana Fischer
Fisiologia, UFPR



Prof Dr Bruno Martynhak
Fisiologia, UFPR



Profª Dra Juliana Geremias Chichorro
Farmacologia, UFPR

Curitiba, 10 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, que, mesmo longe, sempre me apoiou e se manteve disposta a me ajudar em tudo. Especialmente aos meus pais Claudia e Marivaldo.

Agradeço aos meus avós por todos os ensinamentos e oportunidades que me trouxeram até aqui.

Agradeço ao meu tio Danilo e à minha tia Suelen, que são o pedacinho de família em Curitiba.

Agradeço ao Gabriel, a pessoa mais tranquila do mundo e que não mede esforços para me deixar feliz com apenas um sorriso. Sorte em te ter por perto em pensamento, meu amor.

Agradeço às amigas do Laboratório de neurofisiologia da dor, à Natalia, que me ensinou muito sobre ciência e sempre esteve disposta para sanar todas as minhas dúvidas, e à Fernanda Vergara, que me ensinou muito sobre dor crônica e prostaglandinas.

Agradeço a todas as amigas que a graduação em biomedicina me possibilitou, em especial à Aloissa, à Bianca, à Bruna, ao Diego, à Izabel e à Laremi. Todos são sinônimos de amizade e juntos nos mantivemos fortes ao longo dos dias cansativos na graduação.

Agradeço à minha orientadora, professora Luana Fischer, que sempre se manteve disposta a me ensinar e a promover grandes contribuições para a ciência.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, ao departamento de fisiologia e a todos os professores, pelos ensinamentos.

“O elétron não possui propriedades objetivas independentes da minha mente. Na física atômica, não pode mais ser mantida a nítida divisão cartesiana entre matéria e mente, entre o observado e o observador. Nunca podemos falar da natureza sem, ao mesmo tempo, falar sobre nós mesmos.” (Fritjof Capra)

RESUMO

Sono insuficiente e dor crônica são problemas de saúde pública que possuem uma relação bidirecional. As modificações neurais que ocorrem nestas comorbidades possuem mecanismos em comum que possibilitam efeito somatório. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que a restrição de sono (RS) facilita a cronificação da dor em ratos. Para a RS, os animais foram gentilmente manipulados e estimulados com objetos atraentes durante 6 horas diárias. Para o estudo da cronificação da dor, foi utilizado um modelo de hiperalgesia (caracterizada pela redução do limiar nociceptivo) inflamatória crônica. No modelo, ratos recebem uma injeção diária de prostaglandina E₂ (PGE₂, 100 ng) na pata traseira durante 14 dias (fase de indução). Tal procedimento induz um quadro de hiperalgesia que se estende por pelo menos 30 dias após cessarem as injeções (fase de manutenção). Se as injeções de PGE₂ forem associadas a intervenções que facilitam a cronificação da dor, apenas 7 dias de injeção são necessários para a cronificação. Para determinar se a RS facilita a cronificação da dor, ratos Wistar receberam injeções de PGE₂ associadas à RS por 7 dias. Comparado aos controles, os animais que receberam PGE₂ e RS apresentaram um retorno mais lento aos valores basais após cessarem as intervenções. Porém, não se observou o quadro de hiperalgesia crônica, contrariando a hipótese inicial. Para determinar se um tempo maior de RS facilita a cronificação da dor, um novo grupo foi submetido à RS durante 14 dias e recebeu injeções de PGE₂ nos últimos 7 dias. Novamente, não se observou a instalação do quadro de hiperalgesia crônica. No entanto, quando estes animais receberam uma nova injeção de PGE₂, após o retorno do limiar nociceptivo aos valores basais, não houve a redução característica do limiar nociceptivo mecânico e, os mesmos, permaneceram resistentes ao desenvolvimento da hiperalgesia durante 14 dias de injeções subsequentes. Estes resultados sugerem um efeito dual da RS no processo de cronificação da dor, a depender da temporalidade das intervenções, sendo que a RS prévia, quando associada a um evento doloroso, pode proteger o indivíduo de eventos dolorosos subsequentes.

Palavras-chave: Nocicepção; Cronificação da dor; Dor crônica; Restrição de sono; Prostaglandina E₂.

ABSTRACT

Insufficient sleep and chronic pain are both public health problems with a bidirectional relation. Neural changes on these comorbidders may have common mechanisms and a potential summation effect. Therefore, the purpose of the study was to test the hypothesis that sleep restriction (SR) facilitates pain chronification in rats. For the SR, the animals was gently handled and stimulated with attractive objects during 6 hours daily. For the study of pain chronification, was used the model of chronic inflammatory hyperalgesia (characterized by the reduction of the nociceptive threshold). In the model, rats receive a daily injection of prostaglandin E₂ (PGE₂, 100ng) in the hindpaw surface during 14 days (induction phase). The procedure induces a hyperalgesia extending for at least 30 days (maintenance phase). If PGE₂ injections are associated with interventions that facilitate pain chronification, just 7 days of injections are necessary for chronification. To determine if SR facilitates pain chronification, Wistar rats received PGE₂ injections associated with SR during 7 days. Comparing with the controls, the animals that were submitted to PGE₂ injections and SR exhibited a slower return to basal values after the cease of interventions. However, chronic hyperalgesia was not observed, contrary to the initial hypothesis. To determine if a longer SR facilitates pain chronification, a new group underwent SR for 14 days and received PGE₂ injections during the last 7 days. Again, chronic hyperalgesia was not observed. Nevertheless, when these animals received a new PGE₂ injection, after nociceptive threshold return to basal values, there was no characteristic reduction of the mechanical nociceptive threshold and they remained resistant to the development of hyperalgesia for 14 days of subsequeute PGE₂ injections. These results suggest a dual effect of SR on the process of pain chronification, depending on the temporality of the interventions, considering that prior SR associated with a painful event can protect the individual from subsequent painful events.

Keywords: Nociception; Pain chronification; Chronic pain; Sleep restriction; Prostaglandin E₂.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental para caracterização do modelo de hiperalgesia inflamatória crônica induzida por 14 dias de injeção de PGE ₂	31
Figura 2 - Delineamento experimental para testar a hipótese de que a associação entre RS e PGE ₂ durante 7 dias é suficiente para induzir hiperalgesia inflamatória crônica em ratos.	34
Figura 3 - Delineamento experimental para avaliar o efeito tardio da RS associada a injeções de PGE ₂ durante 7 dias.	37
Figura 4 - Delineamento experimental para testar a hipótese de que a associação de 14 dias de RS com injeções diárias de PGE ₂ nos 7 últimos dias é suficiente para induzir hiperalgesia inflamatória crônica em ratos.	39
Figura 5 - Delineamento experimental para avaliar o efeito tardio da RS por 14 dias associada a injeções diárias de PGE ₂ durante os 7 dias finais.	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito pró-nociceptivo induzido por 14 injeções diárias de PGE ₂	32
Gráfico 2: Efeito pró-nociceptivo induzido pela associação entre RS e PGE ₂ durante 7 dias.....	35
Gráfico 3: Efeito de uma nova injeção de PGE ₂ em animais previamente expostos à RS e/ou injeções diárias de PGE ₂ durante 7 dias	38
Gráfico 4: Efeito pró-nociceptivo induzido pela associação entre 14 dias de RS e injeções diárias de PGE ₂ durante os 7 dias finais.....	40
Gráfico 5: Efeito agudo da PGE ₂ em animais previamente expostos à RS durante 14 dias e/ou a 7 injeções diárias de PGE ₂	43
Gráfico 6: 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	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempo de retorno ao limiar basal após 7 dias de RS associada a injeções diárias de PGE ₂	36
Tabela 2 - Tempo de retorno ao limiar basal após 14 dias de RS associada a 7 injeções diárias de PGE ₂	41

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

IASP - Associação internacional para estudo da dor, do inglês *International Association for the Study of Pain*;

PGE₂ - Prostaglandina E₂;

EPISONO - Instituto de sono de São Paulo;

REM - Movimentos oculares rápidos, do inglês *Rapid Eye Movement*;

PAG-RVM - substância cinzenta periaquedutal - bulbo rostro ventral, do inglês *Periaqueductal Grey Matter - Rostral Ventromedial Medula*;

NAc - Núcleo Accumbens;

A_{2A} - Receptores de adenosina do tipo A_{2A};

D₂ - Receptores de dopamina do tipo D₂;

RS - Restrição de sono;

SNC - Sistema nervoso central;

ACC - Córtex cingulado anterior, do inglês *Anterior Cingulate Cortex*,

PFC - Córtex pré-frontal, do inglês *Prefrontal Cortex*

VTA - Área tegmentar ventral, do inglês *Ventral Tegmental Area*

LTP - Potenciação de longa duração, do inglês *Long Term Potentiation*

D₁ - Receptores de dopamina do tipo D₁;

DA - Dopamina;

cAMP - Adenosina monofosfato cíclico, do inglês *Cyclic Adenosine Monophosphate*;

PKA - Proteína quinase A, do inglês *Protein Kinase A*;

PKC - Proteína quinase C, do inglês *Protein Kinase C*;

Nav 1.8 - Canais de sódio 1.8 dependentes de voltagem;

NMDA - N-metil-D-aspartato;

EEG - Eletroencefalograma;

GABA - Ácido gama-aminobutírico, do inglês *Gamma-Aminobutyric Acid*;

ANOVA - Análise de variância.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	DOR E CRONIFICAÇÃO DA DOR	16
2.2	MODELO DE HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA CRÔNICA.....	20
2.3	SONO E DISTÚRBIOS DE SONO.....	21
2.4	INTERSECÇÕES FISIOPATOLÓGICAS ENTRE DOR E SONO	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	ANIMAIS	28
4.2	RESTRIÇÃO DE SONO.....	28
4.3	MODELO EXPERIMENTAL DE DOR CRÔNICA INFLAMATÓRIA	28
4.4	DROGAS	29
4.5	AVALIAÇÃO DO LIMAR NOCICEPTIVO	29
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA	29
4.7	ANÁLISE DE DADOS	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1	EXPERIMENTO 1: CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE DOR CRÔNICA	31
5.1.1	<i>INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ DURANTE 14 DIAS INDUZEM HIPERALGESIA CRÔNICA</i>	<i>31</i>
5.2	EXPERIMENTO 2: RS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE ₂ DURANTE 7 DIAS 33	
5.2.1	<i>RS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ DURANTE 7 DIAS NÃO INDUZ HIPERALGESIA CRÔNICA, MAS DIFICULTA O RETORNO AO LIMAR BASAL</i>	<i>34</i>
5.3	EXPERIMENTO 3: EFEITO TARDIO DA RS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE ₂ DURANTE 7 DIAS	36
5.3.1	<i>RS POR 14 DIAS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ DURANTE 7 DIAS NÃO PRODUZ EFEITOS TARDIOS IDENTIFICÁVEIS NO SISTEMA NOCICEPTIVO.....</i>	<i>37</i>
5.4	EXPERIMENTO 4: RS POR 14 DIAS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE ₂ , DURANTE OS 7 DIAS FINAIS	38
5.4.1	<i>14 DIAS DE RS ASSOCIADA A 7 INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ NÃO INDUZ HIPERALGESIA CRÔNICA</i>	<i>39</i>
5.5	EXPERIMENTO 5: EFEITO TARDIO DA RS POR 14 DIAS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE ₂ DURANTE OS 7 DIAS FINAIS	42
5.5.1	<i>RS POR 14 DIAS ASSOCIADA A 7 INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ IMPEDE A INDUÇÃO DE HIPERALGESIA AGUDA E CRÔNICA POR NOVAS INJEÇÕES DE PGE₂.....</i>	<i>42</i>
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO 1 - TABELA TESTE DO CAMPO ABERTO	56

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A dor é definida pela a IASP (Associação Internacional para Estudo da Dor, do inglês “International Association for the Study of Pain”), como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual, que pode ser real, potencial ou descrita nesses termos. Definição que mostra a complexidade da percepção dolorosa. Embora seja um mecanismo de alerta, que sinaliza perigo e aciona respostas protetoras apropriadas (WOOLF; SALTER, 2000; JULIUS; BASBAUM, 2001), em condições persistentes ou patológicas, a dor perde seu papel biológico e transforma-se em uma doença (ZEILHOFER, 2005). Segundo a Sociedade Brasileira para Estudo da Dor, cerca de 37% da população brasileira sofre de dor crônica ou persistente (SOUZA et al., 2017). De fato, a dor crônica é um problema de saúde pública mundial e a estimativa em países da Europa e Estados Unidos varia entre 10 e 35% da população em geral (BREIVIK et al., 2006; NAHIN, 2015). As consequências da dor crônica vão além da esfera pessoal, de modo que impactam, também, a economia e geram grandes gastos na área da saúde. Estima-se que seja uma importante causa de aposentadoria precoce, licenças médicas, indenizações trabalhistas e baixa produtividade (SÁ et al., 2009; CIPRIANO; ALMEIDA; VALL, 2011). Só nos Estados Unidos, o custo com tratamento e perda de produtividade relacionados à dor em 2010 foi estimado em pelo menos 560 bilhões de dólares (GASKIN; RICHARD, 2012), justificando a necessidade de mais estudos para entender seus mecanismos e, assim aumentar as chances de sucesso terapêutico.

A prostaglandina E₂ (PGE₂) é o principal mediador inflamatório associado à sensibilização das fibras nociceptivas, processo caracterizado pela redução do limiar nociceptivo, ou seja, hiperalgesia. Se a resposta inflamatória for persistente, pode evoluir para um quadro de dor inflamatória crônica. Um modelo para estudar o processo de cronificação da dor, desenvolvido por Ferreira *et al.*, 1990, utiliza o potencial de sensibilização da PGE₂. Neste modelo, o rato recebe uma injeção diária de prostaglandina E₂ (PGE₂, 100 ng) na pata traseira (fase de indução da hiperalgesia inflamatória crônica) durante 14 dias. Após a interrupção das injeções, o efeito hiperalgésico se mantém por, pelo menos, 30 dias (fase de manutenção da

hiperalgesia inflamatória crônica). Isso sugere que a sensibilização persistente do nociceptor leva a mecanismos de plasticidade que culminam com a cronificação da dor (MIRANDA et al., 2015).

Os dados relacionados aos distúrbios de sono e/ou diminuição do tempo total deste também são alarmantes. Segundo pesquisas epidemiológicas realizadas pelo instituto de sono de São Paulo (EPISONO), cerca de 77% da população da cidade de São Paulo sofre com algum distúrbio relacionado ao sono. Outro estudo realizado no Brasil estimou que cerca de 108 milhões de pessoas sofrem com alguma desordem relacionada ao sono (HIROTSU et al., 2014). De fato, os distúrbios de sono também se caracterizam como um problema de saúde pública de ordem mundial (MICHAL et al., 2014; STRINGHINI et al., 2015).

Associando as duas comorbidades, dor e distúrbios de sono, observa-se que existe uma clara relação bidirecional entre diminuição do tempo de sono e aumento da sensibilidade à dor (NICHOLSON; VERMA, 2004; SMITH; HAYTHORNTHWAITE, 2004; KARAMAN, S., 2014). Por exemplo, os distúrbios do sono estão presentes em até 88% dos pacientes com dor crônica (SMITH; HAYTHORNTHWAITE, 2004; MORIN et al., 2006; CHEATLE et al., 2016) e pelo menos 50% dos indivíduos com insônia sofrem de dor crônica (TAYLOR et al., 2007). No entanto, embora não haja dúvidas de que a diminuição do sono aumenta a dor (LENTZ et al., 1999; SMITH; HAYTHORNTHWAITE, 2004; WEI et al., 2010; TOMIM et al., 2016; SARDI et al., 2018a, 2018b) os mecanismos são amplamente desconhecidos.

Estudos recentes têm contribuído para ampliar o entendimento dos mecanismos pelos quais prejuízos no sono aumentam a dor. Por exemplo, demonstrou-se que a privação de sono REM (movimento rápido dos olhos, do inglês, "rapid eye movement") aumenta a sensibilidade à dor ao interferir no funcionamento do sistema descendente PAG-RVM (substância cinzenta periaquedutal - bulbo rostro ventral, do inglês, "periaqueductal grey matter - rostral ventromedial medulla), o mais estudado mecanismo endógeno de modulação da dor (TOMIM et al., 2016). Recentemente também foi demonstrado que o NAc, (Núcleo Accumbens) região que desempenha importante papel na modulação da dor (HAGHPARAST; GHALANDARI-SHAMAMI; HASSANPOUR-EZATTI, 2012) e na regulação do ciclo sono-vigília (LAZARUS et al.,

2013; OISHI et al., 2017), medeia o efeito pró-nociceptivo associado a prejuízos no sono (SARDI et al., 2018a). Dados do nosso laboratório mostraram que a lesão ou inativação farmacológica do NAc, assim como a administração de antagonista de receptores A_{2A} de adenosina ou de agonista de receptores D_2 de dopamina no NAc bloqueia o efeito pró-nociceptivo induzido pela privação de sono REM (SARDI et al., 2018a). A participação do NAc e da PAG no efeito pró-nociceptivo induzido por prejuízos no sono não se limita ao efeito induzido pela privação de sono REM, pois a lesão dessas duas estruturas também abole o efeito pró-nociceptivo induzido pela restrição crônica de sono durante seis horas diárias (SARDI et al., 2018b). Estes dados demonstraram mecanismos importantes através dos quais a diminuição do sono aumenta a sensibilidade à dor, contudo, não há conhecimento sobre estudos que tenham avaliado seu impacto no processo de cronificação da dor. Por exemplo, não se sabe se a restrição de sono (RS) contribui para a cronificação da dor, ou seja, se é determinante para a instalação de uma condição de dor crônica, que persiste mesmo depois que o sono se regulariza. Portanto, o objetivo central deste trabalho foi testar a hipótese de que a RS facilita o processo de cronificação da dor inflamatória. Como poderá ser apreciado durante a leitura, este objetivo foi expandido conforme os resultados parciais eram obtidos

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOR E CRONIFICAÇÃO DA DOR

A experiência dolorosa, não patológica, depende da detecção de estímulos externos por nociceptores. Culminando na transmissão da informação associada a estes sinais até o encéfalo, onde a dor, em toda a sua complexidade, é percebida. Para que este processo ocorra, o estímulo, que tem como característica sinalizar um possível dano tecidual, precisa ser capaz de despolarizar e ativar as fibras C e/ou Aδ periféricas, estas por sua vez transmitem a informação ao sistema nervoso central (SNC) (JULIUS; BASBAUM, 2001; FIELDS, 2004). A primeira sinapse da via nociceptiva se encontra no corno dorsal da medula espinhal e a maioria das fibras nociceptivas secundárias ascendem até o tálamo, através dos tratos espinotalâmico lateral e medial (HODGE; APKARIAN, 1990), até o núcleo parabraquial e até a PAG, através do trato espinoparabraquial (BURITOVA; BESSON; BERNARD, 1998; HUNT; MANTYH, 2001). A partir do tálamo, do núcleo parabraquial e da PAG ocorrem projeções para regiões relacionadas à transformação do estímulo nociceptivo na sensação de “dor” (HUNT; MANTYH, 2001; FIELDS, 2004).

A integralização das projeções para diferentes áreas permite a percepção multidimensional da dor, com características afetivas, somáticas e motoras (HUNT; MANTYH, 2001; APKARIAN, 2008). Projeções para o córtex somatossensorial e para a ínsula estão mais relacionadas ao aspecto somático da dor, que representa a localização, qualidade e duração do estímulo (HUNT; MANTYH, 2001; APKARIAN, 2008). Projeções para regiões como: amígdala, hipotálamo, ACC (córtex cingulado anterior, do inglês, “anterior cingulate cortex”), PFC (córtex pré-frontal, do inglês, “prefrontal cortex”), VTA (área tegmental ventral, do inglês, “ventral tegmental área”), NAc e, novamente, a ínsula, são responsáveis pela dimensão afetiva da dor (HUNT; MANTYH, 2001), motivação de escape, planejamento para cessar o dano e aprendizagem/reforço negativo relacionado ao dano (APKARIAN et al., 2005; BALIKI et al., 2010). Como exemplificado, a fragmentação da transmissão da informação nociceptiva em diferentes áreas, possibilita o recrutamento de múltiplos sítios de modulação em neurônios de diferentes ordens (HEINRICHER et al., 2009).

Os circuitos de modulação possibilitam uma ampliação ou redução das entradas nociceptivas, a depender do contexto em que o organismo se encontra (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). O sistema descendente é o mais conhecido sistema de modulação e possui como figura central o circuito PAG-RVM. Múltiplas aferências, periféricas e encefálicas, convergem para a PAG e eferências, a partir do RVM, modulam a transmissão nociceptiva a nível medular (REYNOLDS, 1969; FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991; FIELDS, 2004). Por conta de uma arquitetura com duas subpopulações de neurônios antagônicos, “ON-cells” e “OFF-cells”, o RVM possui a capacidade dinâmica de integrar as aferências e balancear eferências que facilitem e que inibem a nocicepção (HEINRICHER et al., 2009). As “OFF-cells” são responsáveis pelas eferências antinociceptivas, enquanto as “ON-cells” são responsáveis pelas eferências pró-nociceptivas (HEINRICHER et al., 2009).

A modulação bidirecional da nocicepção é observada em situações de medo e estresse intensos, que refletem no sistema descendente de inibição e estão associados à diminuição da responsividade ao estímulo nociceptivo (hipoalgesia) (HEINRICHER et al., 2009) e na inflamação, que leva ao fenótipo de redução do limiar nociceptivo (alodinia) e de aumento da responsividade ao estímulo nociceptivo (hiperalgesia) (HEINRICHER et al., 2009; WOOLF, 2011).

A manutenção da homeostase entre os sistemas de inibição e de facilitação da transmissão nociceptiva possibilita variações não patológicas no limiar nociceptivo (VANEGAS; SCHAIBLE, 2004; YOU et al., 2010), o qual é definido como o grau mínimo de estímulo que é percebido pelo organismo como dor (MERSKEY et al., 1994). Se tratando de variações patológicas no limiar nociceptivo, as alterações plásticas nos mecanismos regulatórios podem alterar cronicamente o processamento da dor, levar ao desbalanço na facilitação e inibição nociceptiva e consequentemente ao estado de dor crônica (ZEILHOFER, 2005).

A dor crônica é um dos maiores problemas da saúde pública, que, além de afetar diretamente a qualidade de vida de milhões de pessoas, está associado a um gigantesco impacto econômico (PORRECA; OSSIPOV; GEBHART, 2002; GASKIN; RICHARD, 2012). Problemas também são observados no tratamento, pois a taxa de sucesso é de cerca de apenas 30% (BORSOOK; BECERRA; HARGREAVES, 2011).

Para tal, compreender os mecanismos de modulação da dor, alvo da maioria dos fármacos para tratamento da dor crônica, se mostra de grande relevância para o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

As principais origens do processamento nociceptivo alterado se concentram na liberação de citocinas inflamatórias, consequência da ativação crônica do sistema imune (dor crônica de origem inflamatória) e na lesão neural (dor crônica de origem neuropática) (APKARIAN, 2008). Dentre as características fenotípicas observadas na dor crônica, e que correspondem a uma percepção dolorosa alterada, estão: dor espontânea, hiperalgesia e alodinia (APKARIAN, 2008). A dor espontânea é caracterizada por ativação da fibra nociceptiva na ausência de um estímulo nociceptivo (BENNETT, 2012) e, como explorado nos parágrafos anteriores, a hiperalgesia e alodinia são características observadas quando há redução no limiar nociceptivo (MERSKEY et al., 1994). As alterações descritas culminam na amplificação da percepção dolorosa e se relacionam com a diminuição na qualidade de vida observada no indivíduo com dor crônica.

A dor crônica se desenvolve a partir de um processo, a cronificação da dor. Neste âmbito, modificações encefálicas e periféricas são necessárias. Já foi observado que, a nível molecular, um mecanismo de plasticidade sináptica, caracterizado como potenciação de longa duração (LTP, do inglês “long term potentiation”) pode ser observado em diferentes regiões e mediado por diferentes mecanismos (PORRECA; OSSIPOV; GEBHART, 2002; LUO; KUNER; KUNER, 2014). No corno dorsal da medula espinhal, leva a um aumento na eficiência da transmissão glutamatérgica e, como consequência, ocorre a diminuição do limiar de disparo das fibras que ascendem da medula espinhal transmitindo a informação nociceptiva ao encéfalo (LUO; KUNER; KUNER, 2014). Nas “ON-cells” do RVM ocorre o aumento no número de receptores NMDA, que leva a uma prevalência de eferências descendentes que facilitam a transmissão da informação nociceptiva na medula espinhal (PORRECA; OSSIPOV; GEBHART, 2002). Neste contexto, ainda foi demonstrado que pessoas com um sistema descendente inibitório menos eficiente possuem maiores riscos de desenvolvimento de um quadro de dor crônica (YARNITSKY et al., 2008).

Como os centros descendentes de modulação recebem aferências encefálicas, há influência de sistemas encefálicos relacionados à persistência de entradas nociceptivas e à promoção de um estado pró-nociceptivo crônico (PORRECA; OSSIPOV; GEBHART, 2002). Neste âmbito, já foi observado que: a amígdala sofre neuroplasticidade em situações de dor persistente (NEUGEBAUER et al., 2004), o aumento da conectividade entre o PFC e o NAc pode prever o processo de cronificação (APKARIAN, 2008; BALIKI et al., 2012), e os mecanismos dopaminérgicos do NAc são essenciais para a transição da dor aguda para a dor crônica (APKARIAN, 2008; CHANG et al., 2014; DIAS et al., 2015). O NAc possui projeções diretas para a PAG-RVM (CLIFFER; BURSTEIN; GIESLER, 1991), e também para regiões superiores de processamento da dor, como o córtex somatossensorial, o PFC, o hipocampo, o tálamo, o estriado dorsal, o córtex da ínsula e o ACC (CHANG et al., 2014). Regiões que não são exclusivas ao processamento nociceptivo, possuem também funções relacionadas à aprendizagem, à adição e à recompensa (APKARIAN, 2008). O que reflete em diversas hipóteses que relacionam mecanismos de adição e de aprendizagem com a cronificação da dor (APKARIAN, 2008; ELMAN; BORSOOK, 2016).

Subsequente às mudanças plásticas ocorridas na cronificação, a dor passa a ser caracterizada como crônica. Na dor crônica são observadas novas alterações plásticas, que culminam também no estado de depressão, ansiedade e de prejuízos cognitivos (BAIR et al., 2008; GUREJE, 2008; TAYLOR et al., 2016). O sistema dopaminérgico passa a apresentar uma menor ligação aos receptores do tipo D₂ de dopamina (WOOD et al., 2007; TAYLOR et al., 2016), uma menor expressão de receptores de dopamina dos tipos D₁ e D₂ (CHANG et al., 2014), uma diminuição na ativação da VTA, um nível de DA reduzido (CHANG et al., 2014) e uma regulação tônica de dopamina (DA) deficiente (WOOD et al., 2007). Alterações que caracterizam um estado de hipofunção dopaminérgica (TAYLOR et al., 2016). Além de atrofia em múltiplas regiões corticais (GRACHEV; FREDRICKSON; APKARIAN, 2000; APKARIAN et al., 2004).

2.2 MODELO DE HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA CRÔNICA

As diferentes origens da dor crônica e características individuais de percepção dolorosa dificultam o entendimento do processo de cronificação da dor (APKARIAN, 2008). Contudo, estudos em diferentes modelos enriquecem os conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos e são de extrema importância para a busca de melhores terapias para a dor crônica. Considerando a dor crônica de origem inflamatória, Ferreira e colaboradores (1990), desenvolveram um protocolo que utiliza o potencial de sensibilização da PGE₂ para induzir um estado crônico de hiperalgesia e possibilitar o estudo das modificações relacionadas ao processo de cronificação.

O modelo conta com 14 dias de injeção subcutânea de PGE₂ na pata traseira do animal (fase de indução), e foi observado que, após cessarem as injeções, o efeito pró-nociceptivo se mantém por, pelo menos, 30 dias (fase de manutenção). Ainda, se as injeções de PGE₂ forem associadas a intervenções que facilitam a cronificação da dor, apenas 7 injeções diárias são necessárias para induzir o estado crônico (DIAS et al., 2015).

A sensibilização persistente do nociceptor, proporcionada pelas injeções diárias de PGE₂, leva a mecanismos de plasticidade e consequente cronificação da dor (MIRANDA et al., 2015). Os mecanismos envolvidos nas modificações do neurônio nociceptivo primário são os mais conhecidos neste modelo, e eles se baseiam no aumento de cAMP (adenosina monofosfato cíclico) que, na exposição prolongada, aumenta a ativação e transcrição de PKA (proteína quinase A) e PKC (proteína quinase C (VILLARREAL et al., 2009). PKA e PKC são proteínas quinases capazes de fosforilar, entre outras moléculas, canais de sódio 1.8 dependentes de voltagem (Nav 1.8) e também aumentar a sua transcrição (VILLARREAL et al., 2009). Neurônios primários que expressam Nav 1.8 ainda sensibilizam neurônios de segunda ordem encontrados no corno dorsal da medula, pela liberação de fatores neurotróficos que afetam receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e contribuem para a hiperalgesia inflamatória (ZHAO et al., 2006; ZHAO; PHILLIPS; CONSTANTINE-PATON, 2006).

A plasticidade ocorre em diferentes níveis, uma modulação central dependente de dopamina no NAc foi demonstrada por Dias e colaboradores (2015). Observando que o sistema dopaminérgico participa como facilitador de processos de cronificação

por meio da ativação de receptores D₂ e D₁ presentes no NAc, no período de estabelecimento da hiperalgesia persistente (fase de indução). A ativação de heterodímeros de receptores D₂/D₁ para dopamina também estão envolvidos na plasticidade sináptica, por levar ao aumento da sinalização de cálcio (HASBI; O'DOWD; GEORGE, 2011; PERREAULT et al., 2011).

2.3 SONO E DISTÚRBIOS DE SONO

O estado de vigília possui considerável vantagem evolutiva (BROWN et al., 2012), pois permite a interação com o ambiente. O sono é componente vital para a manutenção da homeostase do organismo, muito embora, suas funções ainda sejam um mistério. A possibilidade de diferenciação entre estes dois estados, de sono e de vigília, se dá pelo padrão variável da atividade elétrica em regiões corticais e subcorticais (BUZSÁKI; DRAGUHN, 2004; BROWN et al., 2012), o que leva a classificação em “ondas”, utilizando o eletroencefalograma (EEG) (BUZSÁKI; DRAGUHN, 2004; BROWN et al., 2012), e posterior agrupamento em ondas características do estado de vigília e do estado de sono. Ainda, ambos os estados, de vigília e de sono, possuem características cíclicas e, juntos, classificam-se como um ritmo circadiano.

De maneira generalista, a regulação dos ritmos circadianos é orquestrada por genes relógio que, por meio de alças de feedback, possuem expressão que oscila e influencia genes tecido específicos, levando a alterações fisiológicas ao longo do dia. Oscilações estas que controlam vários processos fisiológicos em que a manutenção de uma ritmicidade é necessária para o funcionamento ideal do organismo (VOIGT; FORSYTH; KESHAVARZIAN, 2013). Com relação ao ciclo sono-vigília, não há uma explicação completa sobre a necessidade de variações na atividade elétrica cortical. Contudo, muito se discute sobre a influência de diferentes padrões de atividade para processos cognitivos como: aprendizagem, consciência e memória (BROWN et al., 2012). Ainda, alterações não relacionadas à atividade elétrica, como o sistema glnfático e a variação da permeabilidade da barreira hematoencefálica, são observadas como variações do ciclo sono-vigília.

Para que o padrão fenotípico de sono e de vigília seja obtido, há influência de diversos circuitos neurais que se inter-relacionam (OH et al., 2019). A indução da vigília conta com sistemas como: o sistema noradrenérgico, no Locus Coeruleus, o sistema serotoninérgico, no Núcleo da Rafe, o sistema dopaminérgico, na VTA, o sistema histaminérgico, no núcleo túbero mamilar e o sistema colinérgico no prosencéfalo (SCAMMELL; ARRIGONI; LIPTON, 2017). Quando ativadas, estas vias mandam eferências para regiões como o hipotálamo, o tálamo e o córtex, e possibilitam a manutenção do padrão fenotípico da vigília (SCAMMELL; ARRIGONI; LIPTON, 2017). Já, durante o sono ocorre a inibição dos núcleos promotores da vigília, via aferências de neurônios GABAérgicos localizados no núcleo pré-óptico do hipotálamo e via moléculas inibitórias produzidas nos núcleos promotores da vigília (BROWN et al., 2012).

A regulação do ciclo sono-vigília ocorre por meio do balanço entre o processo circadiano e os fatores homeostáticos (BORBÉLY, 1982; BROWN et al., 2012; BORBÉLY et al., 2016; OISHI et al., 2017), o que possibilita a interação entre meio externo e metabolismo celular (BROWN et al., 2012). O processo circadiano é comum aos ritmos circadianos, como descrito anteriormente, e possui como figura central os genes relógio localizados no núcleo supraquiasmático. Já o fator homeostático é regulado por metabólitos que se acumulam ao longo da vigília, influenciam os circuitos neurais relacionados à indução do sono e, ao longo do período de sono, diminuem sua concentração (OISHI et al., 2017). Dentre os metabólitos a adenosina possui figura central, mas, óxido nítrico, prostaglandinas e outras citocinas também estão relacionadas (BROWN et al., 2012). Observa-se a necessidade do sono para a variação cíclica dos fatores homeostáticos, pois, os mesmos necessitam de mecanismos que ocorrem no sono para diminuir sua concentração tecidual (OISHI et al., 2017), levando a uma maior influência do controle homeostático nas alterações relacionadas à diminuição do tempo de sono, culminando ainda na necessidade do período de rebote/recuperação de sono. Além destes mecanismos regulatórios, as áreas que induzem os estados de sono e de vigília são comuns a outros processamentos neurais, o que possibilita a influência de alterações cognitivas,

emocionais, sensoriais e metabólicas no ciclo sono-vigília (SAPER; CANO; SCAMMELL, 2005; OISHI et al., 2017; SCAMMELL; ARRIGONI; LIPTON, 2017).

A sociedade de 24 horas tornou natural a redução voluntária do tempo de sono (CHHANGANI et al., 2009). Observa-se uma redução de aproximadamente uma hora e meia de sono por noite, quando comparado ao início do século passado (WALSLEBEN et al., 2004; CHHANGANI et al., 2009). Esta diminuição é reflexo da evolução tecnológica, econômica e social, que, por conta da demanda de horários de trabalho (KORITALA; ÇAKMAKLI, 2018), da grande diversidade tecnológica relacionada ao entretenimento e a invasão da luz no período noturno, leva a maiores situações de restrição de sono. Estes exemplos de situações, juntamente com patologias de origem orgânica, compõem as diversas situações em que se observa desregulação no sono. Os dados epidemiológicos ainda demonstram a frequência alarmante em que os distúrbios estão distribuídos na população, que, segundo pesquisas epidemiológicas realizadas pelo instituto de sono de São Paulo (EPISONO), cerca de 77% da população da cidade de São Paulo sofre com algum distúrbio relacionado ao sono. As consequências são observadas a nível individual e coletivo (VETTER, 2018). Como exemplo: gastos individuais e globais com doenças relacionadas, acidentes de trabalho, perda de produtividade e desemprego.

A diminuição no período de sono leva a consequências na homeostase encefálica, culminado em modificações plásticas em diversos circuitos. Com um intuito evolutivo de reduzir os diversos prejuízos relacionados à diminuição no período de sono, ocorrem alterações que levam a inibição dos mecanismos da vigília, propiciando assim o período de sono rebote (BROWN et al., 2012). Como discutido, os mecanismos relacionados à indução e manutenção da vigília são comuns a diversos processos neurais, o que leva a diversas alterações fenotípicas relacionadas à plasticidade ocasionada pela restrição de sono (SPIEGEL; LEPROULT; VAN CAUTER, 1999; KILLGORE; BALKING; WESENSTEN, 2006; KNUTSON et al., 2007; MULLINGTON et al., 2009), culminando ainda em patologias como: hipertensão (ALTMAN et al., 2012; KIM et al., 2013), obesidade (HART et al., 2013) e depressão (VOLKOW et al., 2008).

2.4 INTERSECÇÕES FISIOPATOLÓGICAS ENTRE DOR E SONO

Como discutido nas seções anteriores, não há exclusividade de função entre os circuitos neurais, mas sim sobreposição de funções e sistemas. Como exemplo os sistemas monoaminérgicos, que estão relacionados à locomoção, ao sistema de recompensa, à modulação da dor e ao ciclo sono-vigília (SCAMMELL; ARRIGONI; LIPTON, 2017).

Com relação às intersecções funcionais relacionadas à modulação da dor e ao ciclo sono-vigília, encontra-se exemplos na ação de medicamentos para dor neuropática, como pregabalina e gabapentina (análogas ao GABA), que causam sonolência (LI et al., 2019); em medicamentos para tratamento de distúrbios de sono, como oxibato de sódio (depressor do SNC), que demonstram efeitos no tratamento de fibromialgia (SPAETH et al., 2012); em patologias, como no Parkinson, que apresenta alterações do sono e de percepção dolorosa (BLANCHET; BREFEL-COURBON, 2018; BAUMANN, 2019); e em intervenções experimentais, como diminuição do tempo de sono produzir um efeito pró-nociceptivo em ratos (TOMIM et al., 2016; SARDI et al., 2018a, 2018b).

Com relação à fisiopatologia, diversos estudos epidemiológicos já observaram uma relação bidirecional entre patologias relacionadas à dor e ao sono; a dor altera o sono e distúrbios do sono alteram a percepção dolorosa (VANINI, 2016). Estudos de correlação observaram que: distúrbios do 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). Distúrbios de sono possuem relação direta com a severidade com que a dor é percebida em pacientes com dor crônica ou após um quadro inflamatório (LYNGBERG et al., 2005; HAMILTON et al., 2008; VANINI, 2016). Ainda, alterações no sono são caracterizadas como fatores de risco para o desenvolvimento de dor crônica, quando associado à lesão traumática ou cirurgia (CREMEANS-SMITH et al., 2006; SMITH et al., 2008). Contudo, os mecanismos envolvidos na relação não são completamente compreendidos.

Estudos recentes do nosso laboratório demonstraram alguns aspectos sobre a base mecanicista do efeito pró-nociceptivo da diminuição do tempo de sono e se

concentram em regiões supraespinhais. Alterações estas que implicam no funcionamento do sistema de modulação descendente PAG-RVM, culminando na diminuição das eferências inibitórias e no aumento das eferências que facilitam a dor (TOMIM et al., 2016); e na atividade de receptores no NAc, onde é observada uma maior atividade de receptores A_{2A}, de adenosina, e uma menor atividade de receptores D₂, de dopamina (SARDI et al., 2018a). Ainda, estes dois mecanismos se relacionam, pois o NAc, local onde convergem informações encefálicas de diversas áreas, manda eferências à PAG e modula o sistema de modulação descendente (GEAR; ALEY; LEVINE, 1999; ZHANG et al., 2013). Em Tomim e colaboradores (2016) ainda foi demonstrado que, após privação de sono REM, a expressão de c-fos no RVM aumenta, possivelmente resultado de uma maior ativação, e, em Sardi e colaboradores (2018a), foi demonstrado que uma lesão na PAG impede o efeito pró-nociceptivo da restrição de sono total. Novamente, demonstrando a importância do sistema descendente PAG-RVM para este efeito.

Ainda a nível encefálico, regiões responsáveis pela dimensão afetiva da dor são alteradas, como o ACC e a ínsula, que demonstram uma menor atividade após estímulo doloroso associado à restrição de sono (TIEDE et al., 2010; KRAUSE et al., 2019), configurando um possível prejuízo na percepção afetiva da dor, motivação de escape e reforço negativo relacionado ao dano (HUNT; MANTYH, 2001; APKARIAN et al., 2005; BALIKI et al., 2010). O aspecto somático também se mostra alterado em experimentos com restrição de sono em seres humanos, que, realizando ressonância magnética funcional, foi observado um aumento na reatividade do córtex somatossensorial primário à estímulos dolorosos (KRAUSE et al., 2019). Neste estudo ainda foi observado uma correlação em que, quanto maior a reatividade do córtex somatossensorial ao estímulo nocivo, menor o limiar nociceptivo (KRAUSE et al., 2019). Além de alterações regionais, observa-se que a diminuição no tempo de sono influencia o sistema opioide, levando a uma desregulação que culmina na diminuição da eficácia dos medicamentos opioides (NASCIMENTO et al., 2007; TOMIM et al., 2016). Levando em conta que pacientes com dor crônica também possuem alterações nos receptores opioides, como diminuição do potencial de ligação (HARRIS

et al., 2007), que também implicam na diminuição da eficácia do tratamento, a associação entre RS e dor crônica poderia intensificar estas alterações funcionais.

Em nível medular, estudos demonstraram que a privação de sono REM possui mecanismos para proporcionar o estado de hiperalgesia em comum aos observados na lesão de nervo, como: redução da atividade GABAérgica (WEI et al., 2010), aumento da atividade glutamatérgica e aumento de óxido nítrico (WEI et al., 2007).

No contexto de resposta inflamatória, a RS influencia nos marcadores inflamatórios, e leva a prevalência do estado pró-inflamatório. Por exemplo, já foi demonstrado que a diminuição do tempo de sono em 50% durante 10 dias induz um aumento nos níveis séricos de IL-6 (interleucina 6) (HAACK; SANCHEZ; MULLINGTON, 2007). Levando em conta que, citocinas inflamatórias, incluindo a IL-6, produzem hiperalgesia (MCMAHON; BEVAN, 2005), a RS poderia facilitar a hiperalgesia inflamatória. De fato, foi demonstrado que a hiperalgesia que se segue por vários dias após a injeção de formalina, um agente pró-nociceptivo inflamatório amplamente utilizado, é aumentada em intensidade e duração quando associada à restrição aguda de sono (VANINI, 2016). Isto sugere que diminuição no tempo de sono associada a um quadro inflamatório prolonga o período de recuperação e poderia, teoricamente, contribuir para o desenvolvimento de um quadro crônico (TOMIM et al., 2016; VANINI, 2016).

Portanto, a diminuição do tempo de sono tem efeitos marcantes sobre o sistema nociceptivo. É incontestável que aumente a sensibilidade a dor. Mas não há evidências diretas que também contribua para a transição da dor aguda para crônica. Este estudo teve como objetivo central avaliar a contribuição da restrição de sono para o processo de cronificação da dor inflamatória.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da restrição de sono sobre o processo de cronificação da dor inflamatória em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se a restrição de sono facilita a cronificação da hiperalgesia inflamatória;
- Determinar o impacto da exposição prévia à restrição de sono em concomitância a estímulos nociceptivos sobre a resposta a novos estímulos nociceptivos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 270 g e 300 g, mantidos em gaiola plástica contendo maravalha, em ciclo 12h/12h claro e escuro, com temperatura ambiente de 22°C±2 e providos de água e comida *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Paraná (CEUA 1279) e seguiram as diretrizes propostas pelo comitê da IASP para pesquisa em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). Foi utilizado o mínimo de animais, apenas o necessário para permitir as análises estatísticas (aproximadamente 8 por grupo).

4.2 RESTRIÇÃO DE SONO

A restrição de sono total (RS) foi realizada a partir do método *Gentle Handling* enriquecido (VANINI, 2016; SARDI et al., 2018b), que consiste em utilizar estímulos gentis e colocar objetos novos na gaiola para manter os animais acordados. Estímulos como: tocar os animais com um pincel de cerdas macias e mover, gentilmente, a caixa de experimentação em movimentos de gangorra, foram utilizados. Durante a restrição de sono, de seis horas diárias e por um período a depender do desenho experimental, os animais foram mantidos em comunidade em suas gaiolas habituais com água e comida *ad libitum*. Os grupos controle foram mantidos exatamente nas mesmas condições e ambiente, mas livres para dormir.

4.3 MODELO EXPERIMENTAL DE DOR CRÔNICA INFLAMATÓRIA

Para avaliação da influência da RS no processo de cronificação da dor foi utilizado como base o modelo de hiperalgesia inflamatória crônica induzida por PGE₂, desenvolvido por Ferreira e colaboradores (1990). Para tal os animais foram submetidos a uma injeção subcutânea diária de PGE₂ (100 ng / 30 µL) na face dorsal da pata traseira durante 7 dias, metade do tempo necessário para cronificar, ou por 14 dias, tempo total necessário para cronificar.

Quando o limiar nociceptivo retornou espontaneamente aos valores basais, também foi avaliada a resposta a um novo estímulo nociceptivo, utilizando uma injeção adicional de PGE₂.

4.4 DROGAS

Prostaglandina E₂ (PGE₂, 100 ng / 30 µL) (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990; DIAS et al., 2015), adquirida da Sigma-Aldrich e diluída em NaCl 0,9%.

4.5 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO

Para avaliar o limiar nociceptivo mecânico foi utilizado o teste de retirada da pata (RANDALL; SELITTO, 1957), no qual um analgesímetro mecânico (Insight, Brasil) aplica, uma força de incremento gradual na face dorsal da pata traseira do animal, até que este retire a pata. Quando a pata é retirada o valor da força máxima aplicada, em gramas, é registrada. Ao longo dos experimentos o limiar nociceptivo foi definido em diferentes momentos, a partir da média de duas a três medidas realizadas.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

A atividade locomotora e comportamento exploratório foram avaliados utilizando o teste do campo aberto. O teste consiste em colocar o animal no meio de uma arena circular (de 1 m de diâmetro e com 16 quadrantes) e avaliar por quantos quadrantes ele transita, considerando quatro patas no quadrante. Este parâmetro foi quantificado durante cinco minutos. A avaliação foi realizada ao final das intervenções experimentais, a fim de verificar se qualquer das intervenções provocaram algum comprometimento da locomoção espontânea.

4.7 ANÁLISE DE DADOS

Os dados obtidos foram avaliados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey, por ANOVA de uma via com medidas repetidas ou por teste t com medidas repetidas. Com relação ao teste de ANOVA de duas vias, como medidas dependentes temos o comportamento nociceptivo (limiar

nociceptivo mecânico), e como medidas independentes os diferentes tratamentos sendo avaliados ao longo do tempo. O nível de significância adotado foi igual ou menor a 0,05. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para realização dos cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa Sigma Plot.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1: CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE DOR CRÔNICA

Com o objetivo de replicar dados da literatura que demonstram que 14 dias de injeções diárias de PGE₂ induzem hiperalgesia crônica (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990), foi avaliado o limiar nociceptivo mecânico ao longo do período de injeções de PGE₂ ou salina (fase de indução, limiar nociceptivo avaliado sempre antes da injeção diária) e ao longo do período de manutenção da hiperalgesia (fase de manutenção). Para tal, foram realizadas intervenções em dois grupos experimentais, conforme figura 1.

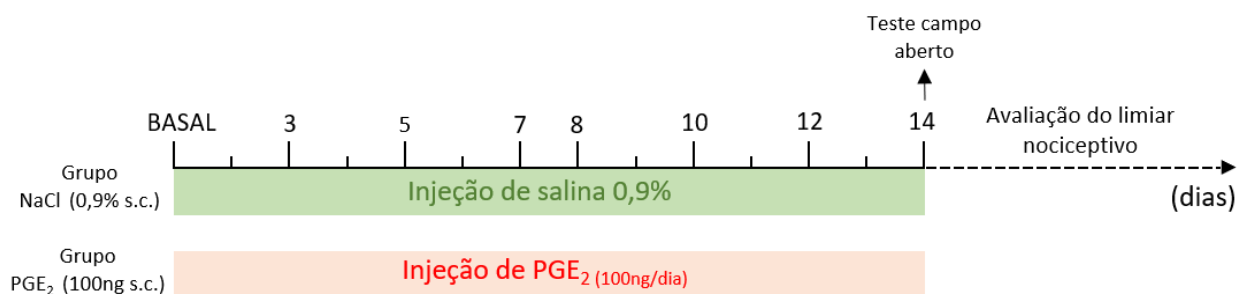


Figura 1 - Delineamento experimental para caracterização do modelo de hiperalgesia inflamatória crônica induzida por 14 dias de injeção de PGE₂

(FONTE: O autor, 2019).

5.1.1 INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ DURANTE 14 DIAS INDUZEM HIPERALGESIA CRÔNICA

Após a primeira injeção de PGE₂, o limiar nociceptivo mecânico retorna ao basal depois de 24 h (Dia 2 da fase de indução, Gráfico 1), o que não ocorre após poucas injeções subsequentes, uma vez que o limiar nociceptivo pré-injeção está significativamente reduzido no dia 4 da fase de indução. O limiar nociceptivo se mantém reduzido durante todo o período de injeções diárias de PGE₂ (fase de indução) e por pelo menos 16 dias após sua interrupção (fase de manutenção) (Gráfico 1, ANOVA duas vias com medidas repetidas, seguido pelo pós teste de Tukey, $F_{\text{tratamento}}(1, 9) = 1023,70$, $p < 0,001$; $F_{\text{tratamento} \times \text{tempo}}(14, 126) = 63,48$, $p < 0,001$).

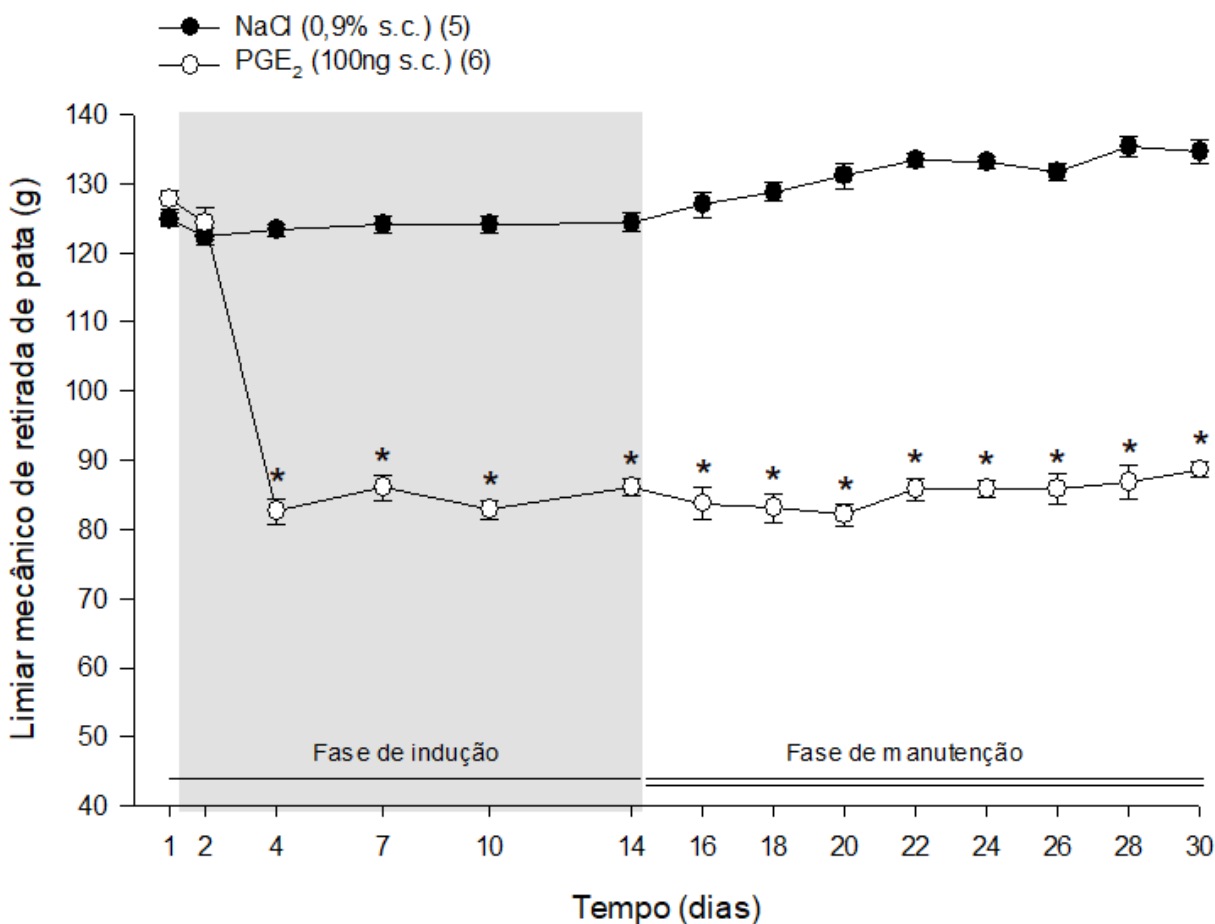


Gráfico 1: Efeito pró-nociceptivo induzido por 14 injeções diárias de PGE₂ - As injeções de PGE₂ (100ng s.c.) foram realizadas diariamente durante os 14 dias da fase de indução (parte sombreada). O limiar nociceptivo mecânico foi aferido antes das injeções diárias, durante a fase de indução da hiperalgesia persistente. O símbolo “*” indica redução significativa do limiar nociceptivo em um mesmo momento (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey $p < 0,05$). Neste e em todos os demais experimentos: I. O número amostral de cada grupo é demonstrado entre parênteses na legenda do gráfico; II. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. do limiar nociceptivo mecânico de cada grupo; III. A parte sombreada em cada gráfico representa o período de injeções diárias de PGE₂ ou NaCl.

Este resultado está de acordo com dados anteriores da literatura que demonstram que o limiar nociceptivo se mantém reduzido por, pelo menos, 30 dias após a interrupção das injeções de PGE₂ (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990; DIAS et al., 2015), o que caracteriza hiperalgesia crônica. Entre as vantagens desse modelo de dor crônica está a possibilidade de estudar os mecanismos que

influenciam o processo de cronificação da dor. Por exemplo, se durante a fase de indução, as injeções diárias de PGE₂, forem associadas a intervenções experimentais que facilitam o processo de cronificação da dor, a hiperalgesia crônica se desenvolve após apenas sete injeções (DIAS et al., 2015). Ao contrário, se as injeções diárias de PGE₂ forem associadas a intervenções experimentais que dificultam o processo de cronificação, a hiperalgesia crônica não se desenvolverá, mesmo após as 14 injeções (DIAS et al., 2015). Outra vantagem desse modelo é que uma vez que a hiperalgesia tenha se tornado crônica, ela se mantém na ausência de influência periférica, ou seja, não está associada a manutenção de lesão tecidual, como em modelos de neuropatia ou de doença articular, por exemplo. Essa desconexão entre dor crônica e lesão tecidual é um achado comum em diversas condições clínicas, o que se atribuiu a alterações plásticas no sistema nociceptivo que garantem a manutenção da dor na ausência de lesão identificável (SLUKA; CLAUW, 2016). Portanto, este modelo mimetiza uma das características de mais difícil compreensão da dor crônica: a plasticidade do sistema nociceptivo que se desenvolve após sua ativação persistente. Durante esta fase, é possível estudar os mecanismos responsáveis pela manutenção da dor e, com isso, identificar estratégias para reverter a dor crônica que já tenha se desenvolvido.

Com relação ao efeito das intervenções experimentais sobre a atividade motora espontânea, não foi observado diferença estatística no teste de campo aberto quando comparado os dois grupos experimentais (teste t com medidas repetidas, $p = 0,833$; dados em anexo).

5.2 EXPERIMENTO 2: RS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ DURANTE 7 DIAS

Com o objetivo de testar a hipótese de que a RS facilita o processo de cronificação da dor, foi realizada associação entre RS e injeções diárias de PGE₂ por 7 dias. Para tal, foram realizados experimentos em quatro grupos experimentais com diferentes condições de tratamento conforme figura 2.

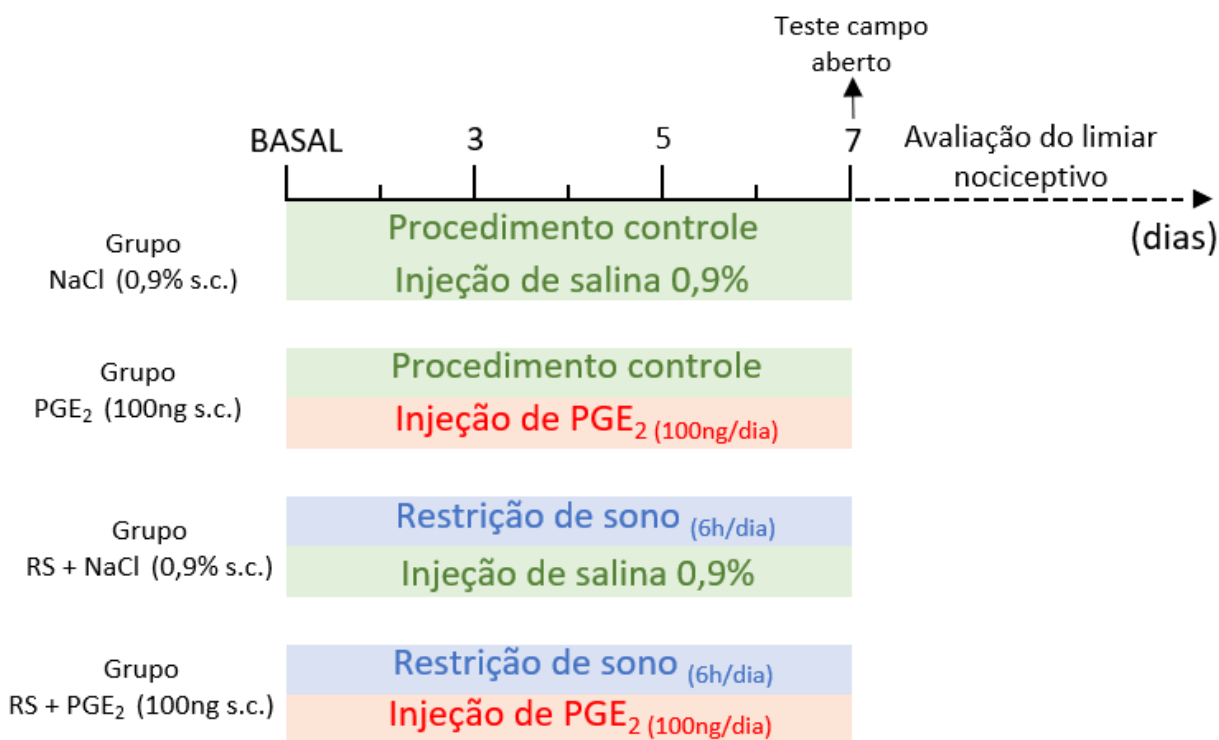


Figura 2 - Delineamento experimental para testar a hipótese de que a associação entre RS e PGE₂ durante 7 dias é suficiente para induzir hiperalgesia inflamatória crônica em ratos.

(FONTE: O autor, 2019)

5.2.1 RS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ DURANTE 7 DIAS NÃO INDUZ HIPERALGESIA CRÔNICA, MAS DIFICULTA O RETORNO AO LIMIAR BASAL

Tanto as injeções diárias de PGE₂ por 7 dias, quanto a RS por 7 dias não induzem hiperalgesia crônica, conforme demonstrado pelo rápido retorno ao limiar nociceptivo basal, após a interrupção destas intervenções (Gráfico 2, ANOVA duas vias com medidas repetidas, seguido pelo pós teste de Tukey, $F_{\text{tratamento}} (3, 25) = 220,94$, $p < 0,001$; $F_{\text{tratamento} \times \text{tempo}} (36, 300) = 44,77$, $p < 0,001$). A associação de ambas as intervenções, ou seja, a exposição concomitante à RS e às injeções diárias de PGE₂ por 7 dias também não induz hiperalgesia crônica. No entanto, o retorno ao limiar basal após a interrupção das intervenções se dá de forma progressiva e muito mais lenta (Gráfico 2).

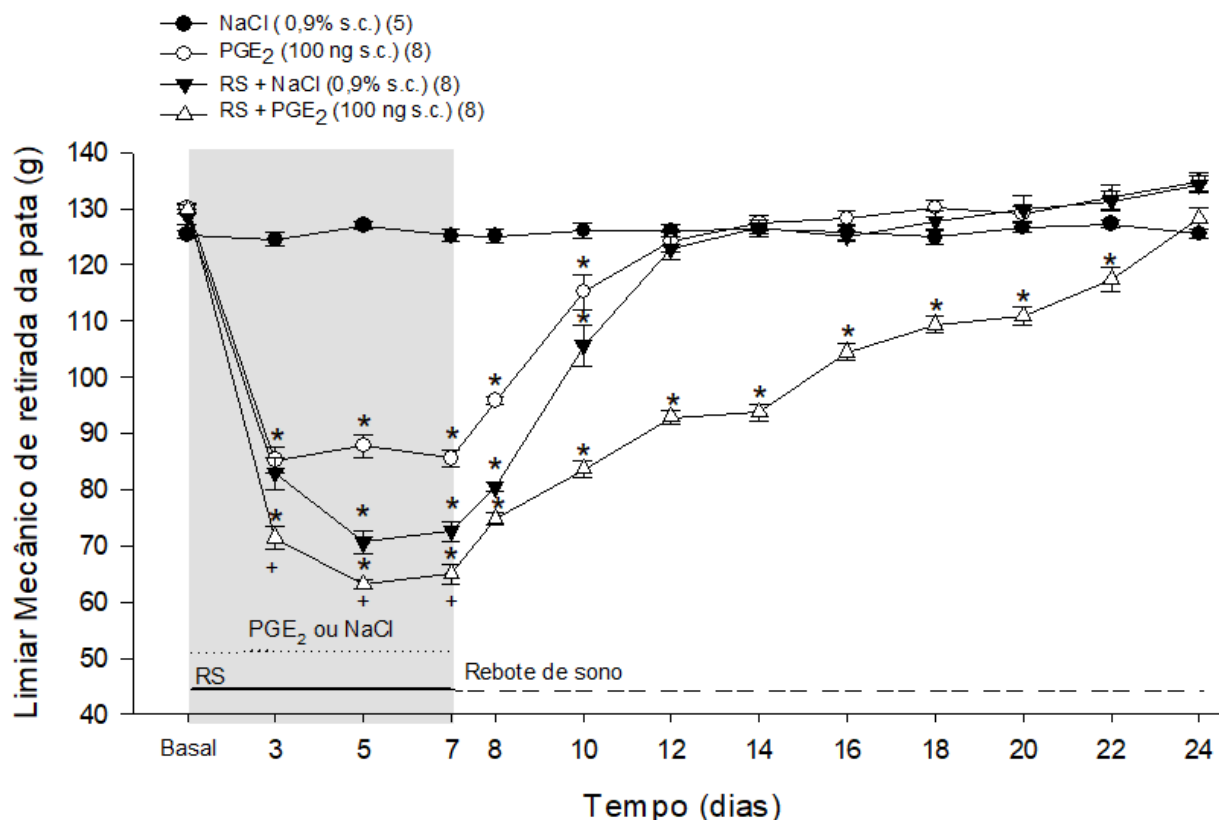


Gráfico 2: Efeito pró-nociceptivo induzido pela associação entre RS e PGE₂ durante 7 dias - A RS foi imposta aos animais por 6 h diárias, com início às 7h da manhã. As injeções de PGE₂ foram realizadas no início do período de RS, após a mensuração do limiar nociceptivo. Estas intervenções foram realizadas por 7 dias consecutivos. O símbolo “*” indica redução significativa do limiar nociceptivo quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas injeções de 0,9% NaCl s.c.. O símbolo “+” indica limiar nociceptivo significativamente menor que aquele de todos os demais grupos (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey $p < 0,05$).

Especificamente, enquanto nos animais submetidos a 7 dias de RS ou de injeções diárias de PGE₂ o limiar nociceptivo retornou ao valor basal em torno de 4 a 6 dias após a interrupção das intervenções, nos animais submetidos concomitantemente as duas intervenções esse retorno só ocorreu após 17 dias (Tabela 1).

TEMPO PARA RETORNO AO LIMIAR BASAL			
Grupo	Tempo	Média ± EPM	P (teste t)
PGE ₂ (100ng s.c.)	BASAL	130,000 ± 1,018	0,069
	4 º dia pós injeção	121,813 ± 3,015	
RS + NaCl (0,9% s.c.)	BASAL	128,542 ± 1,464	0,461
	6 º dia pós RS	127,063 ± 1,422	
RS + PGE ₂ (100ng s.c.)	BASAL	129,917 ± 0,852	0,499
	17 º dia pós injeção + RS	128,250 ± 1,854	

Tabela 1 - Tempo de retorno ao limiar basal após 7 dias de RS associada a injeções diárias de PGE₂ - O tempo necessário para retorno ao limiar nociceptivo pré-experimento ("BASAL"), após as diferentes intervenções experimentais, varia conforme o grupo. O primeiro dia no qual o limiar nociceptivo não diferiu do limiar basal (teste t $p > 0,05$) caracteriza o dia de retorno ao limiar pré-experimento. Ver figura 2 para detalhes a respeito do delineamento experimental.

Estes resultados sugerem um efeito aditivo entre os mecanismos pró-nociceptivos da RS e das injeções de PGE₂, que, apesar de não ser suficiente para induzir hiperalgesia crônica, induz um estado de hiperalgesia mais duradouro, após cessarem os estímulos pró-nociceptivos.

Com relação ao efeito das intervenções experimentais sobre a atividade motora espontânea, não foi observado diferença estatística no teste de campo aberto quando comparado os quatro grupos experimentais (ANOVA de uma via com medidas repetidas, $p = 0,082$; dados em anexo).

5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO TARDIO DA RS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ DURANTE 7 DIAS

Uma vez que não foi demonstrada ação facilitadora, como esperado, sobre o processo de cronificação da dor quando a RS foi associada à injeções diárias de PGE₂ durante 7 dias, nos perguntamos se esta associação poderia levar a alterações plásticas duradouras no sistema nociceptivo, de forma que a resposta a estímulos nocivos posteriores fosse alterada. Para avaliar essa possibilidade, quando todos os

grupos retornaram ao limiar nociceptivo basal, no dia 17 após a interrupção das intervenções, uma nova injeção de PGE₂ (ou NaCl) foi realizada, conforme figura 3.

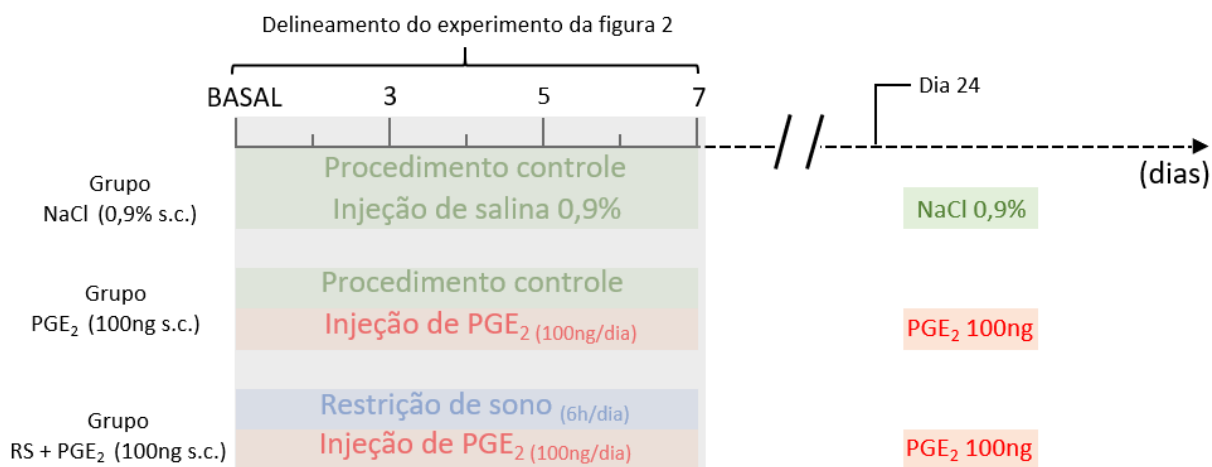


Figura 3 - Delineamento experimental para avaliar o efeito tardio da RS associada a injeções de PGE₂ durante 7 dias.

(FONTE: O autor, 2019)

5.3.1 RS POR 14 DIAS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ DURANTE 7 DIAS NÃO PRODUZ EFEITOS TARDIOS IDENTIFICÁVEIS NO SISTEMA NOCICEPTIVO

A nova injeção de PGE₂ (dia 24) reduziu de forma semelhante o limiar nociceptivo em ambos os grupos; esta redução não difere daquela induzida pela primeira injeção de PGE₂ (dia 1) que esses animais receberam (Gráfico 3 ANOVA duas vias com medidas repetidas, seguido pelo pós teste de Tukey, $F_{\text{tratamento}} (2, 18) = 67,29$, $p < 0,001$; $F_{\text{tratamento} \times \text{tempo}} (8, 72) = 26,18$, $p < 0,001$). Portanto, a exposição prévia a RS associada as injeções diárias de PGE₂ por 7 dias não altera significativamente a intensidade da resposta hiperalgésica aguda induzida por uma nova injeção de PGE₂. Além disso, o limiar nociceptivo em ambos os grupos retornou ao valor basal 24h após a injeção. Concluindo que a duração da resposta hiperalgésica aguda também não foi alterada.

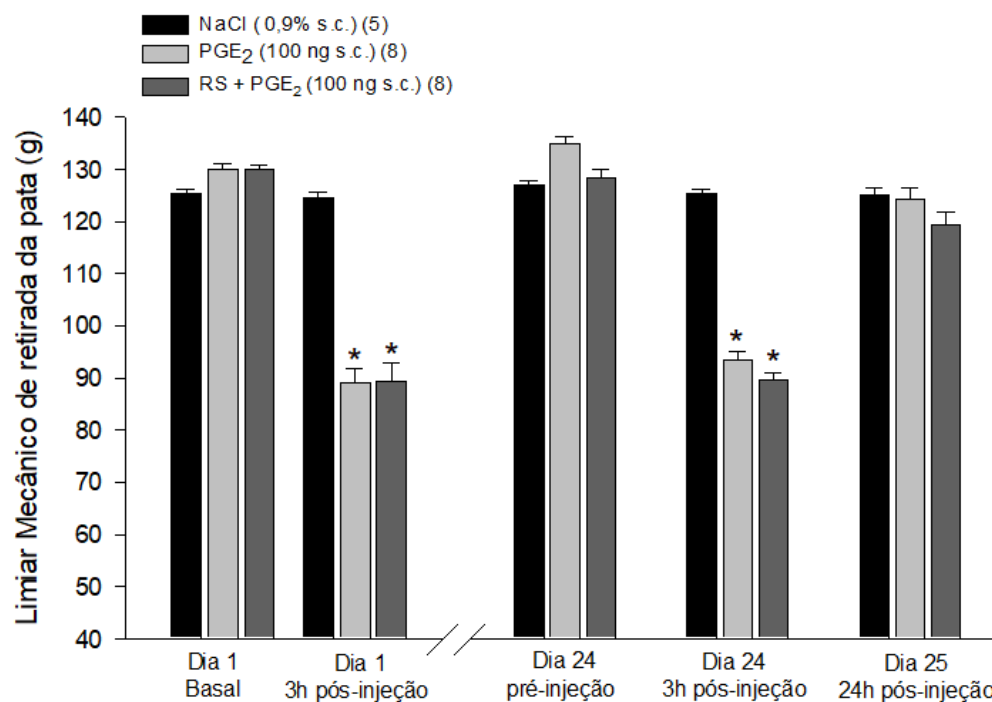


Gráfico 3: Efeito de uma nova injeção de PGE₂ em animais previamente expostos a RS e/ou injeções diárias de PGE₂ durante 7 dias - O conjunto de barras da esquerda representa o limiar nociceptivo dos diferentes grupos antes e 3h após a primeira injeção de PGE₂ ou NaCl ("Dia 1"). A RS e as injeções de PGE₂ continuaram até o dia 7, sendo interrompido a partir do dia 8 (ver figura 3 com o delineamento experimental para detalhes adicionais). No momento em que o último grupo retornou ao limiar nociceptivo basal pré-experimento ("Dia de retorno ao basal", ver tabela 1), uma nova injeção de PGE₂ foi realizada e o limiar nociceptivo foi mensurado 3h e 24h após a injeção. O símbolo "*" indica limiar nociceptivo mecânico significativamente menor quando comparado ao grupo controle NaCl (0,9% s.c.) (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey p<0,05).

5.4 EXPERIMENTO 4: RS POR 14 DIAS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂, DURANTE OS 7 DIAS FINAIS

Com o objetivo de determinar se um período maior de RS facilitaria a cronificação da dor, os animais foram submetidos a 14 dias de RS associada a injeções diárias de PGE₂ durante os 7 últimos dias. Para tanto, foram realizados quatro grupos experimentais com condições de tratamento conforme descrito na figura 4.

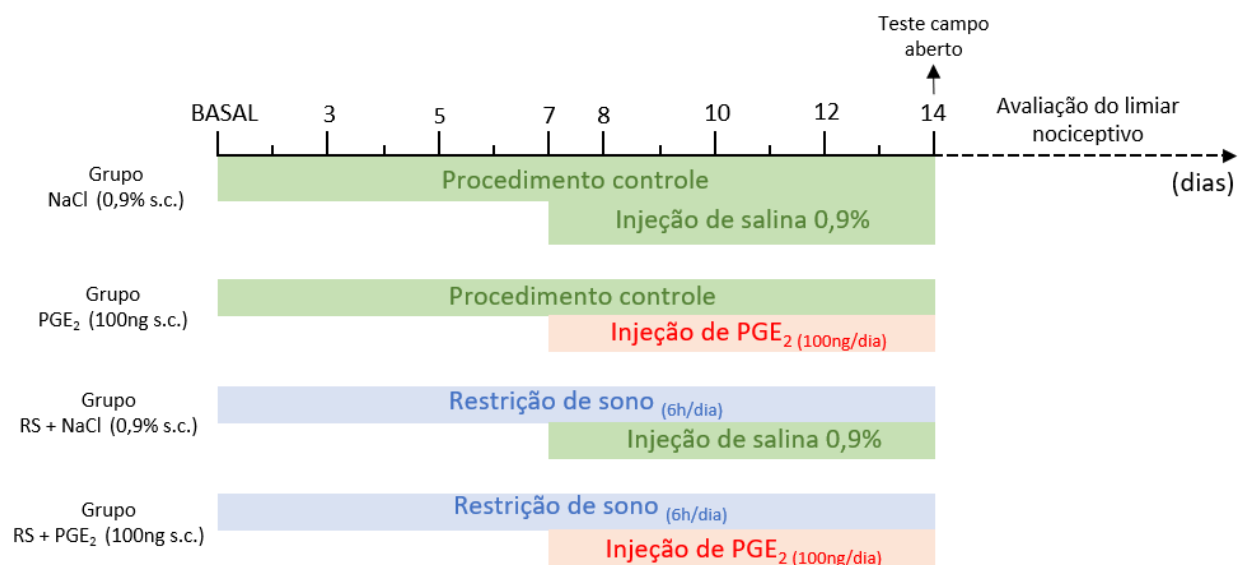


Figura 4 - Delineamento experimental para testar a hipótese de que a associação de 14 dias de RS com injeções diárias de PGE₂ nos 7 últimos dias é suficiente para induzir hiperalgesia inflamatória crônica em ratos.

(FONTE: O autor, 2019)

5.4.1 14 DIAS DE RS ASSOCIADA A 7 INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ NÃO INDUZ HIPERALGESIA CRÔNICA

A restrição de sono por 14 dias induz progressiva diminuição do limiar nociceptivo mecânico que se estabiliza por volta do dia 7 de RS (Gráfico 4, ANOVA duas vias com medidas repetidas, seguido pelo pós teste de Tukey, $F_{\text{tratamento}} (3, 27) = 307,67$, $p < 0,001$; $F_{\text{tratamento} \times \text{tempo}} (30, 270) = 22,93$, $p < 0,001$). Este resultado está de acordo com dados anteriores publicados por nosso laboratório (SARDI et al., 2018b). Como esperado, as injeções diárias de PGE₂, em animais submetidos ao procedimento controle de RS, também induzem progressiva diminuição do limiar nociceptivo mecânico. Contudo, assim que a RS ou as injeções diárias de PGE₂ cessam, o limiar nociceptivo aumenta progressivamente em ambos os grupos, até o retorno ao limiar nociceptivo basal.

Contrariando a hipótese, a associação de 14 dias de RS e 7 injeções diárias de PGE₂ não é suficiente para induzir hiperalgesia inflamatória crônica em ratos, uma vez que quando ambos os procedimentos são interrompidos o limiar nociceptivo aumenta

progressivamente, embora de forma mais lenta quando comparado aos grupos submetidos a apenas uma das intervenções (Gráfico 4).

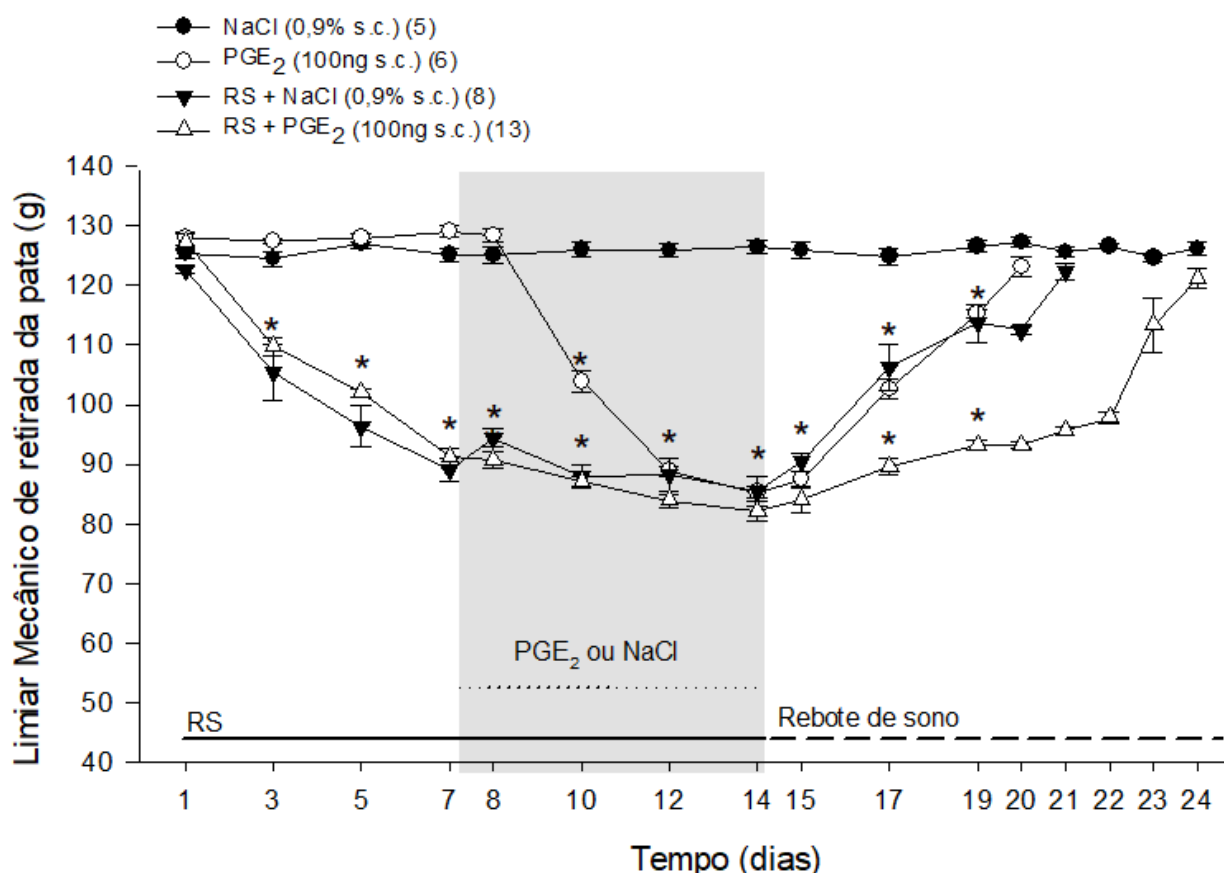


Gráfico 4: Efeito pró-nociceptivo induzido pela associação entre 14 dias de RS e injeções diárias de PGE₂ durante os 7 dias finais - A RS foi imposta aos animais por 6 h diárias, com início às 7 h da manhã por 14 dias consecutivos. As injeções de PGE₂ foram realizadas nos 7 últimos dias de RS (parte sombreada), sempre no início do período de RS e após a mensuração do limiar nociceptivo. Como o retorno ao limiar basal ocorre em diferentes dias, a depender do grupo, a evolução temporal da resposta é interrompida em momentos diferentes, assim que cada grupo retorna ao seu limiar basal pré-experimento. O símbolo “*” indica limiar nociceptivo significativamente menor comparado ao grupo controle, que recebeu apenas injeções de NaCl 0,9% s.c. (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey $p < 0,005$).

Especificamente, enquanto nos animais submetidos a 14 dias de RS ou a 7 injeções diárias de PGE₂ o limiar nociceptivo retornou ao basal em torno de 6 a 7 dias após a interrupção das intervenções, nos animais submetidos concomitantemente as duas intervenções esse retorno demorou 10 dias (Tabela 2).

TEMPO PARA RETORNO AO LIMIAR BASAL			
Grupo	Tempo	Média ± EPM	P (teste t)
PGE ₂ (100ng s.c.)	BASAL	128,000 ± 1,135	0,079
	6º dia pós injeção	123,200 ± 1,594	
RS + NaCl (0,9% s.c.)	BASAL	122,625 ± 0,447	0,250
	7º dia pós RS	118,125 ± 3,531	
RS + PGE ₂ (100ng s.c.)	BASAL	127,359 ± 1,417	0,598
	10º dia pós injeção + RS	125,500 ± 2,930	

Tabela 2 - Tempo de retorno ao limiar basal após 14 dias de RS associada a 7 injeções diárias de PGE₂. O tempo necessário para retorno ao limiar nociceptivo pré-experimento ("BASAL"), após intervenções experimentais, varia conforme o grupo. O primeiro dia no qual o limiar nociceptivo não diferiu do limiar basal (teste t $p > 0,05$) caracteriza o dia de retorno ao limiar pré-experimento. Ver figura 4 para detalhes a respeito do delineamento experimental.

Juntos estes resultados demonstram que mesmo em período prolongado, de 14 dias, a RS não facilita a cronificação da dor, contrariando, portanto, a hipótese experimental.

Interessante notar que o efeito aditivo entre os mecanismos pró-nociceptivos da RS e das injeções de PGE₂, parece perder potência quando o período de RS é estendido. Isso por que o limiar nociceptivo retornou ao valor basal mais rapidamente nos animais submetidos a associação de PGE₂ com 14 dias de RS (retornou no 10º dia pós interrupção) do que com 7 dias de RS (retornou no 17º dia pós interrupção). Além disso, a associação entre PGE₂ e 7 dias de RS (gráfico 2) induziu diminuição significativamente mais intensa do limiar nociceptivo quando comparados a seus respectivos controles, o que não ocorreu com a associação entre PGE₂ e 14 dias de RS (gráfico 4).

Com relação ao efeito das intervenções experimentais sobre a atividade motora espontânea, não foi observado diferença estatística no teste de campo aberto quando comparado os quatro grupos experimentais (ANOVA de uma via com medidas repetidas, $p = 0,173$; dados em anexo).

5.5 EXPERIMENTO 5: EFEITO TARDIO DA RS POR 14 DIAS ASSOCIADA A INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ DURANTE OS 7 DIAS FINAIS

Uma vez que não foi demonstrada qualquer ação facilitadora da RS sobre o processo de cronificação da dor, nos perguntamos se a associação RS e injeções diárias de PGE₂ poderia levar a alterações plásticas duradouras no sistema nociceptivo, de forma que a resposta a estímulos nocivos posteriores fosse alterada. Para avaliar esta possibilidade, assim que cada grupo retornou ao limiar nociceptivo basal, o mesmo foi submetido a uma nova injeção de PGE₂, conforme delineamento demonstrado na figura 5.

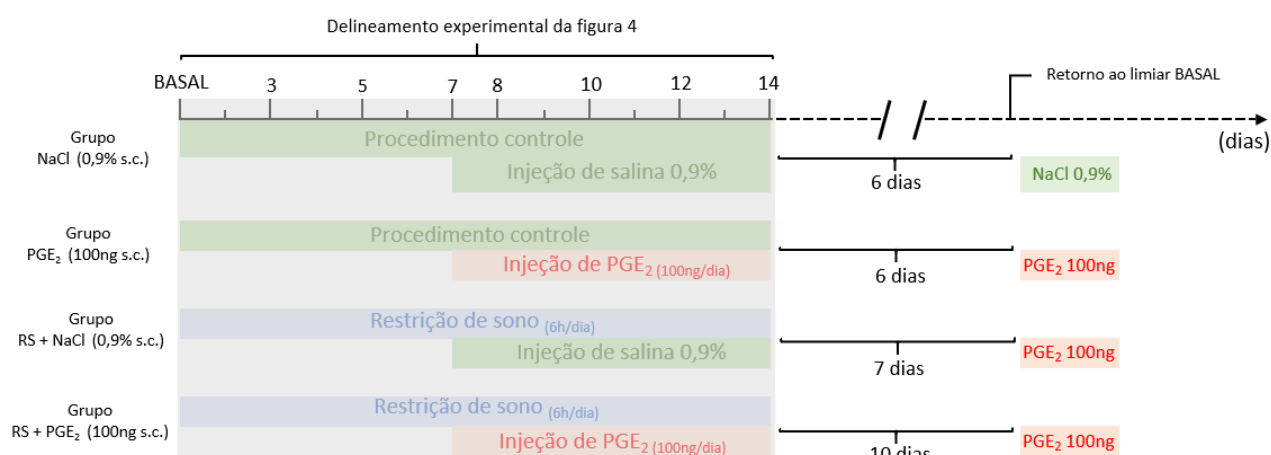


Figura 5 - Delineamento experimental para avaliar o efeito tardio da RS por 14 dias associada a injeções diárias de PGE₂ durante os 7 dias finais.

(FONTE: O autor, 2019)

5.5.1 RS POR 14 DIAS ASSOCIADA A 7 INJEÇÕES DIÁRIAS DE PGE₂ IMPEDE A INDUÇÃO DE HIPERALGESIA AGUDA E CRÔNICA POR NOVAS INJEÇÕES DE PGE₂

Quando os animais previamente expostos apenas à RS (por 14 dias) ou apenas às injeções diárias de PGE₂ (por 7 dias) receberam uma nova injeção de PGE₂, após terem retornado ao limiar nociceptivo basal (dias 7 e 6, respectivamente), observou-se o desenvolvimento da hiperalgesia aguda característica de injeções de PGE₂ na pata. No entanto, quando os animais previamente expostos a associação entre RS e injeções diárias de PGE₂, receberam a nova injeção de PGE₂, após terem retornado ao

limiar nociceptivo basal (dia 10), a hiperalgesia aguda não se desenvolveu (Gráfico 5, ANOVA duas vias com medidas repetidas, seguido pelo pós teste de Tukey, $F_{\text{tratamento}} (3, 27) = 31,67, p < 0,001$; $F_{\text{tratamento} \times \text{tempo}} (9, 81) = 45,18, p < 0,001$).

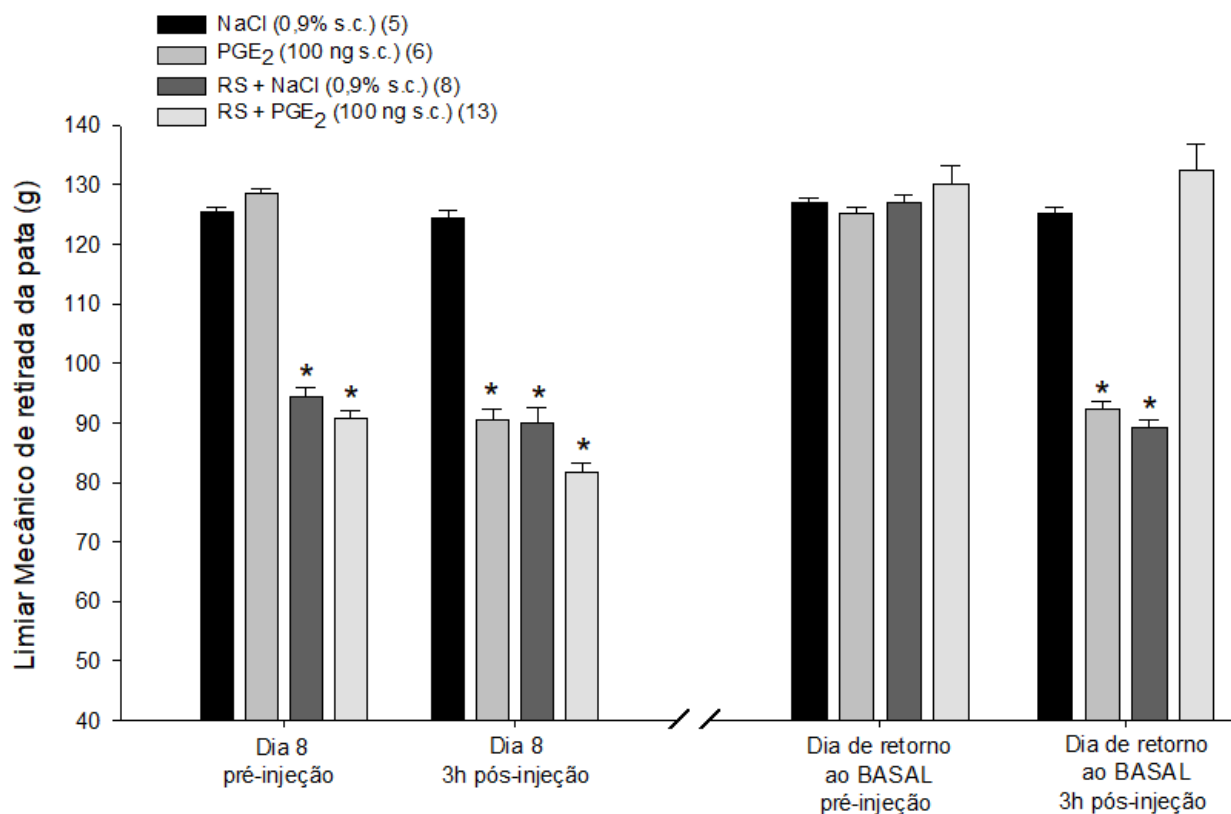


Gráfico 5: Efeito agudo da PGE₂ em animais previamente expostos à RS durante 14 dias e/ou a 7 injeções diárias de PGE₂ - O conjunto de barras da esquerda representa o limiar nociceptivo dos diferentes grupos após 7 dias de RS ou procedimento controle. Neste dia ("Dia 8") o limiar nociceptivo foi mensurado (pré-injeção), a primeira injeção de PGE₂ do experimento 3 foi administrada e o limiar nociceptivo foi novamente mensurado após 3 h (3h pós-injeção). A RS e as injeções de PGE₂ continuaram até o dia 14, quando foram interrompidos (ver figura 5 com o delineamento experimental para detalhes adicionais). Em cada grupo, quando o limiar nociceptivo retornou ao valor basal pré-experimento ("Dia de retorno ao basal", ver tabela 2), uma nova injeção de PGE₂ foi realizada e o limiar nociceptivo foi mensurado antes e após 3h. O símbolo "*" indica limiar nociceptivo significativamente menor comparado ao grupo controle que recebeu apenas injeções de NaCl 0,9% s.c. (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey $p < 0,05$).

Diante desse resultado inusitado, continuamos as injeções de PGE₂, para avaliar o desenvolvimento da hiperalgesia crônica. Para tanto, foram realizadas mais 13 dias

de injeções diárias de PGE₂, totalizando as 14 injeções necessárias e suficientes para induzir hiperalgesia crônica em animais controle. Surpreendentemente os animais não desenvolveram hiperalgesia crônica. Durante todo o período de injeções diárias, o limiar nociceptivo foi apenas levemente reduzido (Gráfico 6, ANOVA duas vias com medidas repetidas, seguido pelo pós teste de Tukey, $F_{\text{tratamento}} (3, 27) = 132,01$, $p < 0,001$; $F_{\text{tratamento} \times \text{tempo}} (15, 135) = 23,01$, $p < 0,001$). Este dado sugere que um longo período de RS (nesse estudo, 14 dias) associado a estímulos nociceptivos persistentes (7 injeções diárias de PGE₂) induz alterações plásticas no sistema nociceptivo que paradoxalmente o protegem de eventos nociceptivos persistentes posteriores.

Alguma plasticidade no sistema nociceptivo também parece ser induzida pelas 7 injeções prévias de PGE₂, pois quando esses animais são novamente expostos a injeções diárias de PGE₂, respondem com uma redução do limiar nociceptivo significativamente maior que os animais expostos apenas a RS (Gráfico 6) e que animais que estão recebendo pela primeira vez as injeções diárias de PGE₂ (dados não mostrados).

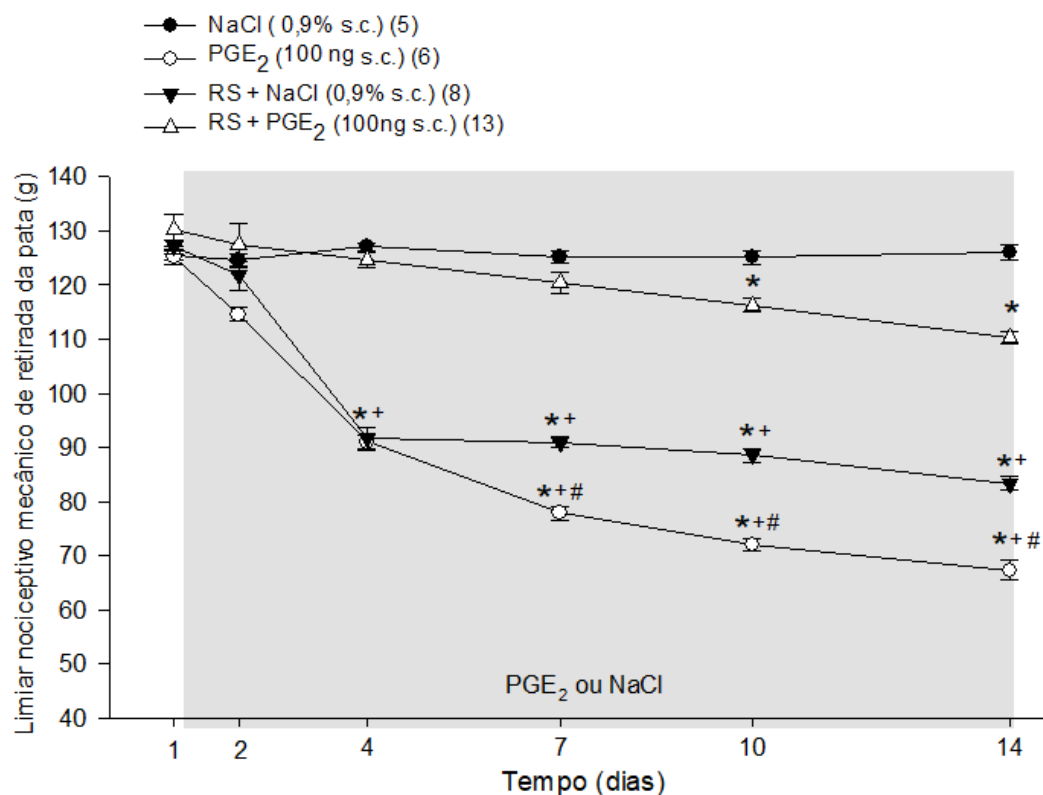


Gráfico 6: Efeito persistente da PGE₂ em animais previamente expostos à RS durante 14 dias associada a injeções diárias de PGE₂ durante os últimos 7 dias - Assim que cada grupo retornou ao limiar basal após a associação de 14 dias de RS com 7 injeções diárias de PGE₂, as injeções diárias de PGE₂ foram reiniciadas e mantidas por um período 14 dias. O símbolo “*” indica limiar nociceptivo significativamente menor quando comparado ao grupo NaCl (0,9% s.c.); o símbolo “+” indica limiar nociceptivo significativamente menor quando comparado ao grupo previamente exposto a RS + PGE₂ (100ng s.c.); o símbolo “#” indica limiar nociceptivo significativamente menor quando comparado ao grupo previamente exposto apenas a RS (ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey p<0,05).

Embora surpreendentes, os dados da figura 6 podem ser interpretados à luz de alguns achados recentes da literatura. Sabe-se que ao longo do período de vigília ocorre o acúmulo de metabólitos e, dentre eles, a adenosina possui um papel importante na indução da pressão de sono (SIMS; WU; DALE, 2013). O aumento de adenosina ao longo da vigília leva a uma maior ativação de receptores adenosinérgicos do tipo A_{2A}, o que leva à internalização (FUXE et al., 2002; HILLION et al., 2002) e diminuição da afinidade (FERRE et al., 1991) de receptores dopaminérgicos do tipo D₂,

co-expressos com os receptores de A_{2A} principalmente em neurônios GABAérgicos do estriado (MOINE et al., 1997). Com uma menor sinalização dopaminérgica por receptores inibitórios do tipo D₂, os neurônios GABAérgicos se mantêm com sua atividade aumentada, resultando em uma redução da atividade motora e do sistema de recompensa, o que gera a hipótese de que a diminuição no tempo de sono está associada à hipofunção dopaminaérgica mesolímbica (VOLKOW et al., 2012). Interessantemente, estes mesmos mecanismos, diminuição da atividade de receptores dopaminérgico do tipo D₂ e aumento da atividade de receptores adenosinérgicos do tipo A_{2A}, também são responsáveis pelo efeito pró-nociceptivo da privação de sono (SARDI et al., 2018a). Possivelmente devido a eferências do NAc que modulam diretamente a PAG e promovem a diminuição da inibição descendente e aumento da facilitação descendente (SARDI et al., 2018a). Ideia que é reforçada por dados que demonstram que lesão na PAG impede os efeitos pró-nociceptivos da RS (SARDI et al., 2018b).

A atividade dopaminérgica mesolímbica implica na atenuação da dor aguda, mas é essencial para o processo de cronificação da dor (DIAS et al., 2015). Com relação a influência do sistema dopaminérgico para a cronificação da hiperalgesia inflamatória, foi demonstrado por Dias et al., 2015 que a administração intra-NAc de GBR 12909 (inibidor da recaptção de DA) facilita a cronificação e que a administração de antagonista D₂ ou D₁ intra-NAc impede a cronificação. Portanto é possível que o efeito protetor da RS sobre o desenvolvimento da dor crônica se deva a plasticidade do sistema dopaminérgico mesolímbico. Um período longo de RS poderia levar a uma hipofunção persistente do sistema dopaminérgico que impediria um posterior processo de cronificação da dor. Embora plausível, essa possibilidade não explica por que a hiperalgesia aguda em resposta à PGE₂ também não se desenvolve e por que há a necessidade de associação com um estímulo nociceptivo persistentes (representado neste estudo por injeções diárias de PGE₂).

Com base nestas informações, foi realizado um experimento piloto para testar a hipótese de que a RS por 14 dias, associada a 7 injeções de PGE₂ nos 7 dias finais, promove resistência ao efeito pró-nociceptivo de novas injeções de PGE₂ por induzir hipofunção dopaminérgica mesolímbica. Com este objetivo, GBR 12909 (inibidor da

recaptação de dopamina) foi administrado intra-NAc com o intuito de aumentar a neurotransmissão dopaminérgica no NAc e verificar se isso previne a resistência ao efeito das novas injeções de PGE₂. A administração intra-NAc de GBR 12909 (0,5nmol/0,25µL) foi realizada um dia após a interrupção das injeções de PGE₂ e da RS, em dois diferentes grupos: por um período de 4 dias e por um período de 7 dias.

Estes dados preliminares mostram que a administração intra-NAc de GBR 12909 por 4 dias previne a resistência ao efeito das novas injeções de PGE₂, pois se observa o efeito pró-nociceptivo característico quando realizada a nova injeção (dados preliminares, não mostrados). Esse dado sugere que o aumento da neurotransmissão dopaminérgica no NAc previne os efeitos protetores da associação prévia entre RS e injeção de PGE₂.

Por outro lado, a administração intra-NAc de GBR 12909 por 7 dias impediu que os animais retornassem ao limiar nociceptivo basal. Ou seja, a associação de RS durante 14 dias com injeção de PGE₂ nos últimos 7 dias seguidas de 7 dias de GBR 12909 intra-NAc é capaz de levar ao quadro de hiperalgesia inflamatória crônica (dados preliminares, não mostrados). Embora estes dados preliminares precisem ser confirmados (os experimentos estão em fase de expansão no número experimental), eles sugerem que a hipofunção dopaminérgica no NAc seja a chave tanto para a resistência ao efeito pró-nociceptivo de novas injeções de PGE₂, quanto para a inabilidade da RS em facilitar a cronificação da dor.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a RS não facilita a cronificação da dor em ratos. Ao contrário, sugere um efeito dual da associação entre RS e estímulos nociceptivos persistentes (representado neste estudo por injeções diárias de PGE₂). Quando a RS foi associada à estimulação nociceptiva persistente durante 7 dias, ocorre um efeito aditivo: embora a hiperalgesia não se torne crônica, ela é mais intensa e duradoura que em animais submetidos a apenas uma dessas intervenções isoladamente. Ao contrário, quando a RS é realizada por 14 dias, associada à estimulação nociceptiva persistente durante os 7 últimos dias, esse efeito aditivo perde potência. Além disso, uma vez que a resposta nociceptiva tenha retornado aos valores normais, surpreendentemente

esses animais deixam de responder a novos estímulos nociceptivos. Ou seja, os animais aparentemente se tornam resistentes à dor aguda e ao desenvolvimento da dor crônica. Dados preliminares sugerem que uma hipofunção dopaminérgica mesolímbica pode ser a responsável tanto pela inabilidade da RS associada à PGE₂ em facilitar a cronificação da dor, quanto pela resistência tardia à dor aguda e crônica.

Por fim, levando em consideração a alta prevalência de distúrbios de sono e dor crônica na população e ainda a taxa de sucesso no tratamento ser de apenas cerca de 30% (BORSOOK; BECERRA; HARGREAVES, 2011), compreender os mecanismos através dos quais o comprometimento do sono interfere na sensibilidade à dor e, principalmente, no processo de cronificação da dor se mostra essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que aumentem o sucesso do manejo desta condição.

REFERÊNCIAS

- ALTMAN, N. G. et al. Sleep duration versus sleep insufficiency as predictors of cardiometabolic health outcomes. **Sleep Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1261–1270, 2012.
- APKARIAN, A. V. et al. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 46, p. 10410–10415, 2004.
- APKARIAN, A. V. et al. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **European Journal of Pain**, v. 9, n. 4, p. 463–484, 2005.
- APKARIAN, A. V. Pain perception in relation to emotional learning. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 18, n. 4, p. 464–468, 2008.
- BAIR, M. J. et al. Association of depression and anxiety alone and in combination with chronic musculoskeletal pain in primary care patients. **Psychosomatic Medicine**, v. 70, n. 8, p. 890–897, 2008.
- BALIKI, M. N. et al. 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.
- BALIKI, M. N. et al. Corticostriatal functional connectivity predicts transition to chronic back pain. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1117–1119, 2012.
- BAUMANN, C. R. Sleep–wake and circadian disturbances in Parkinson disease: a short clinical guide. **Journal of Neural Transmission**, v. 126, n. 7, p. 863–869, 2019.
- BENNETT, G. J. What is spontaneous pain and who has it? **Journal of Pain**, v. 13, n. 10, p. 921–929, 2012.
- BLANCHET, P. J.; BREFEL-COURBON, C. Chronic pain and pain processing in Parkinson's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 87, p. 200–206, 2018.
- BORBÉLY, A. A. A two process model of sleep regulation. **Hum Neurobiology**, v. 1, n. 3, p. 195–204, 1982.
- BORBÉLY, A. A. et al. The two-process model of sleep regulation: A reappraisal. **Journal of Sleep Research**, v. 25, n. 2, p. 131–143, 2016.
- BORSOOK, D.; BECERRA, L.; HARGREAVES, R. Biomarkers for chronic pain and analgesia. Part 1: the need, reality, challenges, and solutions. **Discovery Medicine**, v. 11, n. 58, p. 197–207, 2011.
- BREIVIK, H. et al. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. **European Journal of Pain**, v. 10, n. 4, p. 287–333, 2006.
- BROWN, R. E. et al. Control of sleep and wakefulness. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 3, p. 1087–1187, 2012.
- BURITOVA, J.; BESSON, J. M.; BERNARD, J. F. Involvement of the spinoparabrachial pathway in inflammatory nociceptive processes: A c-Fos protein study in the awake rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 397, n. 1, p. 10–28, 1998.
- BUZSÁKI, G.; DRAGUHN, A. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. **Science**, v. 304, n. 5679, p. 1926–1929, 2004.
- CHANG, P. C. et al. Role of nucleus accumbens in neuropathic pain: Linked multi-scale evidence in the rat transitioning to neuropathic pain. **Pain**, v. 155, n. 6, p. 1128–1139, 2014.
- CHEATLE, M. D. et al. Assessing and Managing Sleep Disturbance in Patients with Chronic Pain. **Anesthesiology clinic**, v. 34, n. 2, p. 379–393, 2016.

- CHHANGANI, B. S. et al. Pain Sensitivity in Sleepy Pain-Free Normals. **Sleep**, v. 32, n. 8, p. 1011–1017, 2009.
- CIPRIANO, A.; ALMEIDA, D. B. De; VALL, J. Profile of chronic pain patients seen in a pain outpatient setting of a major Southern Brazil. **Revista Dor**, v. 12, n. 4, p. 297–300, 2011.
- CLIFFER, K. D.; BURSTEIN, R.; GIESLER, G. J. Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 852–868, 1991.
- CREMEANS-SMITH, J. K. et al. Sleep disruptions mediate the relationship between early postoperative pain and later functioning following total knee replacement surgery. **Journal of Behavioral Medicine**, v. 29, n. 2, p. 215–222, 2006.
- DIAS, E. V. 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.
- ELMAN, I.; BORSOOK, D. **Common Brain Mechanisms of Chronic Pain and Addiction**Neuron, 2016. .
- FERRE, S. et al. Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7238–7241, 1991.
- 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.
- FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 565–575, 2004.
- FIELDS, H. L.; HEINRICHER, M. M.; MASON, P. Neurotransmitters in Nociceptive Modulatory Circuits. **Annual Review of Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 219–245, 1991.
- FUXE, K. et al. Heteromerization of Adenosine and Dopamine Receptor Subtypes: Relevance for Neuronal Integration in Normal and Pathological States. p. 199–204, 2002.
- GASKIN, D. J.; RICHARD, P. The economic costs of pain in the United States. **Journal of Pain**, v. 13, n. 8, p. 715–724, 2012.
- GEAR, R. W.; ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 16, p. 7175–7181, 1999.
- GRACHEV, I. D.; FREDRICKSON, B. E.; APKARIAN, A. V. Abnormal brain chemistry in chronic back pain: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. **Pain**, v. 89, p. 7–18, 2000.
- GUREJE, O. Comorbidity of pain and anxiety disorders. **Current Psychiatry Reports**, v. 10, n. 4, p. 318–322, 2008.
- HAACK, M.; SANCHEZ, E.; MULLINGTON, J. M. Elevated inflammatory markers in response to prolonged sleep restriction are associated with increased pain experience in healthy volunteers. **Sleep**, v. 30, n. 9, p. 1145–1152, 2007.
- HAGHPARAST, A.; GHALANDARI-SHAMAMI, M.; HASSANPOUR-EZATTI, M. Blockade of D1/D2 dopamine receptors within the nucleus accumbens attenuated the antinociceptive effect of cannabinoid receptor agonist in the basolateral amygdala. **Brain Research**, v. 1471, p. 23–32, 2012.
- HAMILTON, N. A. et al. Fibromyalgia: The Role of Sleep in Affect and in Negative Event

- Reactivity and Recovery. **Health Psychology**, v. 27, n. 4, p. 490–497, 2008.
- HARRIS, R. E. et al. Decreased central μ -opioid receptor availability in fibromyalgia. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 37, p. 10000–10006, 2007.
- HART, C. N. et al. The Association between Time in Bed and Obesity Risk in Young Adults. **Behavioral Sleep Medicine**, v. 11, n. 5, p. 321–327, 2013.
- HASBI, A.; O'DOWD, B. F.; GEORGE, S. R. Dopamine D1-D2 receptor heteromer signaling pathway in the brain: Emerging physiological relevance. **Molecular Brain**, v. 4, n. 1, p. 2–7, 2011.
- HEINRICHER, M. M. et al. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 214–225, 2009.
- HILLION, J. et al. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 18091–18097, 2002.
- HIROTSU, C. et al. Sleep complaints in the Brazilian population: Impact of socioeconomic factors. **Sleep Science**, v. 7, n. 3, p. 135–142, 2014.
- HODGE, C. J.; APKARIAN, A. V. The spinothalamic tract. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 5, n. 4, p. 363–397, 1990.
- HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 83–91, 2001.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 2001.
- KARAMAN, S., T. K. Prevalence of sleep disturbance in chronic pain. **Rev Med Pharmacol Sci**, v. 18, n. 17, p. 2475–2481, 2014.
- KILLGORE, W. D.; BALKING, T. J.; WESENSTEN, N. J. Impaired decision making following 49 hours of sleep deprivation. **Journal of Sleep Research**, v. 15, p. 7–13, 2006.
- KIM, Y. et al. Insufficient and excessive amounts of sleep increase the risk of premature death from cardiovascular and other diseases: The Multiethnic Cohort Study. **Preventive Medicine**, v. 57, n. 4, p. 377–385, 2013.
- KNUTSON, K. L. et al. The metabolic consequences of sleep deprivation. **Sleep Medicine Reviews**, v. 11, n. 3, p. 163–178, 2007.
- KORITALA, B. S. C.; ÇAKMAKLI, S. The human circadian clock from health to economics. **PsyCh Journal**, v. 7, n. 4, p. 176–196, 2018.
- KRAUSE, A. J. et al. The pain of sleep loss: A brain characterization in humans. **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 12, p. 2291–2300, 2019.
- LAZARUS, M. et al. Role of the basal ganglia in the control of sleep and wakefulness. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 5, p. 780–785, 2013.
- LENTZ, M. . et al. Effects of selective slow wave sleep disruption on musculoskeletal pain and fatigue in middle aged women. **J Rheumatol**, v. 26, n. 7, p. 1586–1592, 1999.
- LI, N. et al. LPM580098, a novel triple reuptake inhibitor of serotonin, noradrenaline, and dopamine, attenuates neuropathic pain. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.
- LUO, C.; KUNER, T.; KUNER, R. Synaptic plasticity in pathological pain. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 6, p. 343–355, 2014.
- LYNGBERG, A. C. et al. Has the prevalence of migraine and tension-type headache changed over a 12-year period? A Danish population survey. **European Journal of Epidemiology**, v. 20, n. 3, p. 243–249, 2005.

- MCMAHON, S. B.; BEVAN, S. Inflammatory mediators and modulators of pain. In: **Textbook of pain**. [s.l.: s.n.]p. 49–72.
- MERSKEY, H. et al. **Classification of Chronic Pain**. Second Edi ed. [s.l.] IASP Press, 1994.
- MICHAL, M. et al. Complaints of sleep disturbances are associated with cardiovascular disease: Results from the Gutenberg health study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- MIRANDA, J. et al. Effect of pain chronification and chronic pain on an endogenous pain modulation circuit in rats. **Neuroscience**, v. 286, p. 37–44, 2015.
- MOINE, C. Le et al. Dopamine-adenosine interactions in the striatum and the globus pallidus: Inhibition of striatopallidal neurons through either D2 or A(2A) receptors enhances D1 receptor-mediated effects on c-fos expression. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 20, p. 8038–8048, 1997.
- MORIN, C. M. et al. Epidemiology of insomnia: Prevalence, self-help treatments, consultations, and determinants of help-seeking behaviors. **Sleep Medicine**, v. 7, n. 2, p. 123–130, 2006.
- MULLINGTON, J. M. et al. Cardiovascular, Inflammatory, and Metabolic Consequences of Sleep Deprivation. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 51, n. 4, p. 294–302, 2009.
- NAHIN, R. L. Estimates of Pain Prevalence and Severity in Adults: United States, 2012. **Journal of Pain**, v. 16, n. 8, p. 769–780, 2015.
- NASCIMENTO, D. C. et al. Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain μ -opioid receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 178, n. 2, p. 216–220, 2007.
- NEUGEBAUER, V. et al. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist**, v. 10, n. 3, p. 221–234, 2004.
- NICHOLSON, B.; VERMA, S. Comorbidities in Chronic Neuropathic Pain. **Pain Medicine**, v. 5, p. 9–27, 2004.
- OH, J. et al. The role of co-neurotransmitters in sleep and wake regulation. **Molecular Psychiatry**, v. 24, n. 9, p. 1284–1295, 2019.
- OISHI, Y. et al. Slow-wave sleep is controlled by a subset of nucleus accumbens core neurons in mice. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2017.
- 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.
- PERREAULT, M. L. et al. The Dopamine D1–D2 Receptor Heteromer in Striatal Medium Spiny Neurons: Evidence for a Third Distinct Neuronal Pathway in Basal Ganglia. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 5, p. 1–8, 2011.
- PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 319–325, 2002.
- RANDALL; SELITTO. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 111, p. 409–419, 1957.
- REYNOLDS, D. V. Surgery in the Rat during Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation Sex Differences in Verbal and Performance IQ's of Children Undergoing Open-Heart Surgery. **Science**, v. 164, n. 3878, p. 444–445, 1969.
- SÁ, K. et al. Prevalence of chronic pain and associated factors in the population of Salvador, Bahia. **Revista de Saude Publica**, v. 43, n. 4, p. 622–630, 2009.

- SAPER, C. B.; CANO, G.; SCAMMELL, T. E. Homeostatic, circadian, and emotional regulation of sleep. **Journal of Comparative Neurology**, v. 493, n. 1, p. 92–98, 2005.
- SARDI, N. F. et al. Nucleus accumbens mediates the pronociceptive effect of sleep deprivation: The role of adenosine A2A and dopamine D2 receptors. **Pain**, v. 159, n. 1, p. 75–84, 2018a.
- SARDI, N. F. 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, 2018b.
- SCAMMELL, T. E.; ARRIGONI, E.; LIPTON, J. O. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. **Neuron**, v. 93, n. 4, p. 747–765, 2017.
- SIMS, R. E.; WU, H. H. T.; DALE, N. Sleep-Wake Sensitive Mechanisms of Adenosine Release in the Basal Forebrain of Rodents: An In Vitro Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- SLUKA, K. A.; CLAUW, D. J. Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. **Neuroscience**, v. 338, p. 114–129, 2016.
- SMITH, M. T. et al. Sleep onset insomnia symptoms during hospitalization for major burn injury predict chronic pain. **Pain**, v. 138, n. 3, p. 497–506, 2008.
- SMITH, M. T.; HAYTHORNTHWAITE, J. A. How do sleep disturbance and chronic pain inter- relate? Insights from the longitudinal and cognitive-behavioral clinical trials literature. **Sleep Med Rev**, v. 8, n. 2, p. 119–132, 2004.
- SOUZA, J. B. et al. Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey. **Pain Research and Management**, 2017.
- SPAETH, M. et al. Sodium oxybate therapy provides multidimensional improvement in fibromyalgia: Results of an international phase 3 trial. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 71, n. 6, p. 935–942, 2012.
- SPIEGEL, K.; LEPROULT, R.; VAN CAUTER, E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. **Lancet**, v. 354, n. 9188, p. 1435–1439, 1999.
- STRINGHINI, S. et al. Association of socioeconomic status with sleep disturbances in the Swiss population-based CoLaus study. **Sleep Medicine**, v. 16, n. 4, p. 469–476, 2015.
- TAYLOR, A. M. W. et al. Mesolimbic dopamine signaling in acute and chronic pain: Implications for motivation, analgesia, and addiction. **Pain**, v. 157, n. 6, p. 1194–1198, 2016.
- TAYLOR, P. et al. Comorbidity of chronic insomnia with medical problems. **Sleep**, v. 30, n. 2, p. 213–218, 2007.
- TIEDE, W. et al. Sleep restriction attenuates amplitudes and attentional modulation of pain-related evoked potentials, but augments pain ratings in healthy volunteers. **Pain**, v. 148, n. 1, p. 36–42, 2010.
- TOMIM, D. H. 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.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: Inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 3, p. 295–309, 2004.
- VANINI, G. Sleep Deprivation and Recovery Sleep Prior to a Noxious Inflammatory Insult Influence Characteristics and Duration of Pain. **Sleep**, v. 39, n. 1, p. 133–142,

2016.

VETTER, C. Circadian disruption: What do we actually mean? **European Journal of Neuroscience**, 2018.

VILLARREAL, C. F. et al. Acute and persistent nociceptive paw sensitisation in mice: The involvement of distinct signalling pathways. **Life Sciences**, v. 85, n. 23–26, p. 822–829, 2009.

VOIGT; FORSYTH; KESHAVARZIAN. Circadian Disruption: Potential Implications in Inflammatory and Metabolic Diseases Associated With Alcohol. **Alcohol Research**, v. 35, n. 1, p. 87–96, 2013.

VOLKOW, N. D. et al. Sleep deprivation decreases binding of [¹¹C]raclopride to dopamine D₂/D₃ receptors in the human brain. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 34, p. 8454–8461, 2008.

VOLKOW, N. D. et al. Evidence That Sleep Deprivation Downregulates Dopamine D₂R in Ventral Striatum in the Human Brain. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 19, p. 6711–6717, 2012.

WALSLEBEN, J. A. et al. Sleep and reported daytime sleepiness in normal subjects: The Sleep Heart Health Study. **Sleep**, v. 27, n. 2, p. 293–298, 2004.

WEI, H. et al. Pain-related behavior following REM sleep deprivation in the rat: Influence of peripheral nerve injury, spinal glutamatergic receptors and nitric oxide. **Brain Research**, v. 1148, n. 1, p. 105–112, 2007.

WEI, H. et al. Intrathecal administration of a gap junction decoupler, an inhibitor of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1, or a GABAA receptor agonist attenuates mechanical pain hypersensitivity induced by REM sleep deprivation in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 2, p. 377–383, 2010.

WOOD, P. B. et al. Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 12, p. 3576–3582, 2007.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765–1769, 2000.

WOOLF, C. J. **Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain** *Pain*, mar. 2011. .

YARNITSKY, D. et al. Prediction of chronic post-operative pain: Pre-operative DNIC testing identifies patients at risk. **Pain**, v. 138, n. 1, p. 22–28, 2008.

YOU, H. J. et al. Endogenous descending modulation: Spatiotemporal effect of dynamic imbalance between descending facilitation and inhibition of nociception. **Journal of Physiology**, v. 588, n. 21, p. 4177–4188, 2010.

ZEILHOFER, H. U. The glycinergic control of spinal pain processing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2027–2035, 2005.

ZHANG, J.-P. et al. Projections of nucleus accumbens adenosine A_{2A} receptor neurons in the mouse brain and their implications in mediating sleep-wake regulation. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 7, n. 43, 2013.

ZHAO, J.-P.; PHILLIPS, M. A.; CONSTANTINE-PATON, M. Long-Term Potentiation in the Juvenile Superior Colliculus Requires Simultaneous Activation of NMDA Receptors and L-type Ca²⁺ Channels and Reflects Addition of Newly Functional Synapses. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 49, p. 12647–12655, 2006.

ZHAO, J. et al. Nociceptor-derived brain-derived neurotrophic factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v.

31, n. 3, p. 539–548, 2006.

ZIMMERMANN. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983.

ANEXO 1 - TABELA TESTE DO CAMPO ABERTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA			
Experimento	Grupo	Média $\pm$ EPM	P
1	NaCl (0,9% s.c.)	59,40 $\pm$ 1,17	0,833
	PGE ₂ (100ng s.c.)	59,50 $\pm$ 2,19	
2	NaCl (0,9% s.c.)	64,80 $\pm$ 6,88	0,082
	PGE ₂ (100ng s.c.)	44,00 $\pm$ 4,77	
	RS + NaCl (0,9% s.c.)	61,62 $\pm$ 6,58	
	RS + PGE ₂ (100ng s.c.)	49,62 $\pm$ 9,43	
4	NaCl (0,9% s.c.)	64,80 $\pm$ 6,88	0,173
	PGE ₂ (100ng s.c.)	87,40 $\pm$ 14,55	
	RS + NaCl (0,9% s.c.)	76,87 $\pm$ 4,79	
	RS + PGE ₂ (100ng s.c.)	65,14 $\pm$ 7,70	