



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Pâmela Lonardoní Micheletti

**O efeito da restrição aguda de sono e do
labirinto em cruz elevado na geração do
estresse oxidativo sistêmico e cerebral em
ratos**

Londrina

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS PATOLÓGICAS**

PÂMELA LONARDONI MICHELETTI

**O efeito da restrição aguda de sono e do
labirinto em cruz elevado na geração do
estresse oxidativo sistêmico e cerebral em
ratos**

Defesa de Dissertação
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Experimental, da Universidade
Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani

LONDRINA-PARANÁ

2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Célio Roberto Estanislau

Prof. Dr. Rubens Cecchini

Prof^a. Dra. Alessandra L. C. Armani

Dedico mais essa conquista a Deus, por me iluminar e abençoar em todos os momentos de minha vida. A meus pais Júlio César Micheletti e Anita Maria Lonardoní Micheletti, pela dedicação, amor e confiança em mim depositada. Ao meu esposo Paulo Augusto Farina e ao meu filho Thomas, pelo carinho e compreensão. É uma dedicatória especial a minha avó Maria Chiareli Lonardoní, que cuidou do meu filho para que pudesse concluir meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora Prof. Dra. Alessandra Lourenço Czechini Armani, que soube me conduzir com sabedoria apesar de sua ausência e distância devido ao nascimento do seu filho, Pedro.

A minha família, pelo apoio, credibilidade e carinho, pois acredito que a Família é à base de todo o conhecimento e valores que nos permitem alcançar nossos objetivos com dignidade.

Aos professores Rubens Czechini e Célio Estanislau pela co-orientação e ensinamentos valiosos.

Ao meu amigo Zui, pela alegria, risadas, momentos divertidos e por suas músicas inesquecíveis...

Ao meu amigo Pedro Sebastião, que foi além do meu guia dentro do laboratório, mas uma pessoa iluminada que me mostrou e ensinou a palavra de Deus.

As colegas doutorandas Flávia, Carolina e Vânia por me conduzirem durante esse ano e me ensinarem os protocolos dos experimentos na ausência da minha orientadora Alessandra.

Ao meu amigo Lucas, (que será um cientista renomado!) por sua inestimável ajuda, paciência e por também me ensinar e auxiliar durante os experimentos.

A todos os meus colegas de laboratório Rafaela, Renato, Flávia, Tatiane, Vanessa, Vânia, Victor, Carolina, Lucas, Zui, Larissa, Ana Carla, Cláudia, Sara, Márcio, Fernando, Pedro, Professor Jair, Fábio, Francielle, Xexeu por momentos únicos e inesquecíveis que guardarei no meu coração com muito carinho.

A dona Irene e Adernaldo, que cuidam da limpeza do laboratório todas as manhãs.

Ào Téo, que sempre me socorreu com minhas dúvidas sobre informática.

Àos meus colegas da Pós-graduação Francielle, Fabio, Carolina, Clisia, Ana Cristina, Donizete, Cláudia, Natalia, Paula, Matheus, Silas e Samanta.

À equipe “Rock Balboa” Patrícia, Sílvia, Simoni, Fernanda e Daniela, amigas queridas as quais tenho muitas saudades!!!

Às secretárias Ana e Vânia.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Só se vê bem com o coração.
O essencial é invisível aos olhos!

O Pequeno Príncipe
de Antoine de Saint-Exupéry

APOIO FINANCEIRO

CAPES

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a capacidade da restrição de sono (RS) gerar estresse oxidativo (EO) no cérebro e no sangue de ratos submetidos à restrição de sono por 72 horas, avaliar a influência do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) na geração do EO sistêmico e cerebral e verificar o comportamento do rato dentro do LCE. Foram utilizados 64 ratos Wistar macho com peso entre 200g – 250g. Para os testes os animais foram divididos em quatro grupos: controle, LCE, RS e RS submetido ao LCE. Após os experimentos os ratos foram imediatamente sacrificados e realizadas as análises de estresse oxidativo com as amostras de cérebro e sangue coletadas. O teste do LCE mostrou que a RS não gerou ansiedade nos ratos, mas prejudicou sua atividade motora ($t [30] = 2,362$; $p=0,02$). A lipoperoxidação do cérebro dos ratos indica que os animais submetidos ao LCE por 5 minutos foram os que apresentaram maior lesão oxidativa ($p<0,0001$). Em contrapartida, os ratos RS aparentemente não sofreram lipoperoxidação de suas estruturas celulares. Os níveis de TRAP e GSH no cérebro não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. E o nível de nitrito cerebral não foi alterado por 72h de RS. No entanto os animais que passaram pelo teste do LCE durante 5 minutos apresentaram uma redução das concentrações de NO neste tecido ($p<0,006$). Sistemicamente a QL induzida por t-butil mostra que o grupo que apresentou maior lipoperoxidação foi os que sofreram a RS por 72h. Em contrapartida, 5 minutos no LCE também foram suficientes para que ocorresse o ataque de espécies reativas de oxigênio. Já a lipoperoxidação do plasma mostra novamente que o teste do LCE sozinho gerou maior estresse oxidativo em relação aos outros grupos. Sistemicamente a capacidade antioxidante total não foi alterada pela RS por 72h. A análise da concentração de GSH das hemácias mostra que o teste do LCE por 5 minutos elevou seu nível no sangue dos ratos submetidos ao LCE. A análise da produção de NO plasmático revela que o grupo LCE apresentou maior síntese de NO ($p<0,003$) e que a RS não alterou as concentrações de NO no plasma dos ratos. Estes resultados revelam que tanto a RS quanto o LCE gera estresse oxidativo em diferentes proporções dependendo do tecido analisado. No cérebro apenas o LCE provocou lesões oxidativas, entretanto, quando o sangue do animal é analisado, tanto a RS quanto o LCE geraram estresse oxidativo nas hemácias e no plasma, evidenciando um estresse sistêmico.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the ability of SD to generate oxidative stress (OS) in the brain and blood of rats subjected to SD for 72 hours to assess the influence of test elevated plus maze (EPM) in the generation of systemic and cerebral OS and verify the behavior of rats in the EPM. We used 64 male Wistar rats weighing between 200g - 250g. For testing the animals were divided into two groups, the SD (n = 32) and controls (n = 32). These groups were divided into two subgroups after testing where the SD one subgroup (n = 16) was sacrificed and the other (n = 16) passed the test of EPM and was immediately sacrificed and performed biochemical analysis of the samples collected. The EPM test showed that the SD did not cause anxiety in mice, but it impaired his motor activity ($t [30] = 2.362, p = 0.02$). Lipid peroxidation of the brain of mice indicates that the control animals subjected to EPM for 5 minutes were presented the highest oxidative injury ($p < 0.0001$). In contrast, the SD rats apparently did not suffer injury of their cellular structures. The levels of TRAP and GSH in the brain showed no significant differences between the groups. And the level of brain nitrite was not changed for 72 of SD. However the rats that stood the test of the EPM for 5 min, showed a reduction in the concentrations of NO in their tissue ($p < 0.006$). Systemically the chemiluminescence-induced t-butyl shows that the group had a higher lipid peroxidation were those who suffered for 72 SD. In contrast, 5 minutes in the EPM were also sufficient for the attack caused by reactive oxygen species. Since the lipid peroxidation of plasma shows again that the test of EPM alone caused increased oxidative stress in relation to other groups. Systemically total antioxidant capacity was not altered by SD for 72 hours. The analysis of the GSH concentration of red blood cells shows that the test of the EPM for 5 minutes increased its level in the blood of control rats submitted to EPM. Analysis of NO production in plasma shows that the group that has stood the test of the EPM for 5 minutes showed higher synthesis of NO ($p < 0.003$) and that SD did not alter the concentrations of NO in the plasma. In the brain only EPM caused oxidative damage, however, when the animal's blood is analyzed, both the SD and the EPM generated oxidative stress in erythrocytes and plasma, indicating a systemic stress.

Lista de abreviaturas e siglas

ABAP – 2,2-azo-bis (2-amidinopropano diidrocloreto).

AC – Área central.

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico.

BA – Braço aberto.

BF – Braço fechado.

cNOS – NO sintase constitutiva.

CRF – Fator liberador de corticotrofina.

CTL – Controle.

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial.

EO – Estresse oxidativo.

ERO – Espécies reativas de oxigênio.

ERN – Espécies reativas de nitrogênio.

GABA - Ácido γ -Aminobutírico.

GH – Hormônio do crescimento.

GSH – Glutathione reduzida.

GSH-Px – Glutathione peroxidase.

GSH-Rd – Glutathione reductase.

GSSG – Glutathione oxidada.

HPA - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio.

IMC – Índice de massa corporal.

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível.

LCE – Labirinto em cruz elevado.

LOO[•] – Radical peroxil.

NO[•] – Óxido Nítrico.

NOS – Óxido nítrico sintase.

NREM – Sono não REM

O₂^{•-} – Ânion radical superóxido.

¹O₂ - Oxigênio singlet.

HO[•] – Radical Hidroxila.

ONOO⁻ - Peroxinitrito.

QL – Quimiluminescência.

REM – Movimento rápido dos olhos

RNA – Ácido ribonucléico.

RS – Restrição de sono.

SOD – Superóxido dismutase.

SNC – Sistema nervoso central.

TI – Tempo de indução.

TRAP – Capacidade antioxidante total.

TSH - hormônio tireoestimulante.

t-Butil – tert-butil-hidroperóxido.

T3 – triiodotironina.

T4 – tiroxina.

URL – Unidade relativa de luz.

Lista de figuras

Figura 1 - Representação de um hipnograma obtido durante uma noite inteira de sono.....	2
Figura 2 - Esquema da liberação do cortisol pelas supra-renais através da ativação do eixo HPA.....	3
Figura 3 - Padrão característico da secreção diária de cortisol em um indivíduo saudável.....	4
Figura 4 - Delineamento experimental com as divisões dos grupos experimentais.....	28
Figura 5 - Imagem dos experimentos realizados com os ratos.....	29
Figura 6 - Imagem do labirinto em cruz elevado (LCE).....	
Nenhuma entrada de sumário foi encontrada.	31
Figura 7 – Avaliação da ansiedade no teste do LCE.....	39
Figura 8 – Análise comportamental no teste do LCE. Frequência de entradas nas extremidades dos braços abertos e frequência de entradas nas extremidades dos braços fechados.....	40
Figura 9 – Análise do teste do LCE. Total de quadrados andados nos braços fechados e tempo gasto na área central.....	41
Figura 10 – Avaliação da lipoperoxidação de cérebro de ratos (40mg/mL) por quimiluminescência induzida por tert-butil-hidroperóxido.....	44
Figura 11 - Análise da capacidade antioxidante total (TRAP) por quimiluminescência do cérebro de ratos.....	45
Figura 12 - Avaliação dos níveis de glutathiona (GSH) no cérebro de ratos.....	46

Figura 13 - Determinação da concentração de nitrito cerebral pelo método cádmio-cobre.....	47
Figura 14 – Análise da lipoperoxidação pelo método de quimiluminescência (QL) induzida por tert-butil-hidroperóxido das hemácias de rato.....	48
Figura 15 - Avaliação da lipoperoxidação pelo método de quimiluminescência (QL) induzida por tert-butil-hidroperóxido do plasma de rato.....	49
Figura 16 – Análise da capacidade antioxidante total por quimiluminescência.....	50
Figura 17 – Determinação da concentração de GSH nas hemácias de ratos.....	51
Figura 18 – A análise da concentração de nitrito pelo método cádmio-cobre.....	52

Lista de tabelas

Tabela 1 – Avaliação dos parâmetros comportamentais analisados no LCE.....	43
---	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Animais e reagentes.....	27
3.2 Delineamento experimental.....	28
3.3 72 horas de RS.....	28
3.4 Análise comportamental no teste do LCE.....	30
3.5 Análise do índice de massa corporal (IMC).....	31
3.6 Processamento das amostras.....	32
3.7 Descrição das técnicas para os ensaios de estresse oxidativo.....	33
3.8 Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1 Avaliações comportamentais no teste do LCE.....	38
4.2 Análise do estresse oxidativo no cérebro.....	44
4.3 Análises do estresse oxidativo no sangue.....	48
4.4 Análise do índice de massa corporal (IMC).....	53

5. DISCUSSÃO	54
5.1 Discussões referentes às análises do teste do LCE.....	55
5.2 Discussões referentes aos resultados obtidos das amostras de cérebro.....	57
5.3 Discussões referentes aos resultados obtidos das amostras de sangue.....	61
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 – O Sono e a Restrição de Sono

“O sono é um estado ordinário de consciência, complementar ao da vigília (ou estado desperto), em que há repouso normal e periódico, caracterizado, tanto no ser humano como nos outros animais superiores, pela suspensão temporária da atividade perceptivo-sensorial e motora voluntária. Trata-se de um processo ativo envolvendo múltiplos e complexos mecanismos fisiológicos e comportamentais em vários sistemas e regiões do sistema nervoso central” (INSTITUTO DO SONO).

Dormir não é necessário apenas para que haja um descanso físico e mental. É durante o sono que importantes processos metabólicos ocorrem e que, se alterados, podem afetar a homeostase de todo o organismo. Estudos mostram que quem dorme menos do que o necessário tem menor vigor físico, envelhece mais precocemente, está mais propenso a infecções, à obesidade, à hipertensão e ao diabetes (CRONFLI, 2002). Durante o sono que o nosso organismo realiza funções importantíssimas com consequências diretas à saúde como o fortalecimento do sistema imunológico, secreção e liberação de hormônios (hormônio do crescimento, insulina e outros), consolidação da memória e descanso da musculatura (CRONFLI, 2002).

O sono nos seres humanos é dividido habitualmente em duas fases principais: sono REM (Movimento Rápido dos Olhos) e o sono não-REM. O sono não-REM, que apresenta ondas sincronizadas no eletroencefalograma, pode ser subdividido em quatro fases: estágios 1 e 2, e estágios 3 e 4. Estes

últimos, em conjunto, são conhecidos como sono delta ou sono de ondas lentas. As fases seguem uma sequência na qual existe uma predominância do sono delta durante a primeira metade da noite e eventos mais prolongados e frequentes de sono REM durante o último terço da noite, como mostra a figura 1 (PALMA et al., 2007). O sono evolui em ciclos de fases não-REM e REM e durante esses ciclos eventos fisiológicos específicos ocorrem, tais como a liberação do hormônio do crescimento (GH) durante o sono delta, ao mesmo tempo em que se observa uma atividade reduzida do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (BORN & FEHM, 2000). Já o sono REM, ou sono paradoxal, caracteriza-se pela baixa amplitude e alta frequência das ondas cerebrais, episódios de movimentos oculares rápidos (daí a sigla em inglês, REM) e atonia muscular. Além disso, este estágio é denominado também de sono dos sonhos, uma vez que é o período no qual estes ocorrem. Em um indivíduo normal, o sono não-REM e o sono REM alternam-se ciclicamente ao longo da noite repetindo-se a cada 70 a 110 minutos, com 4 a 6 ciclos por noite (INSTITUTO DO SONO). O número destes ciclos tende a diminuir com a idade.

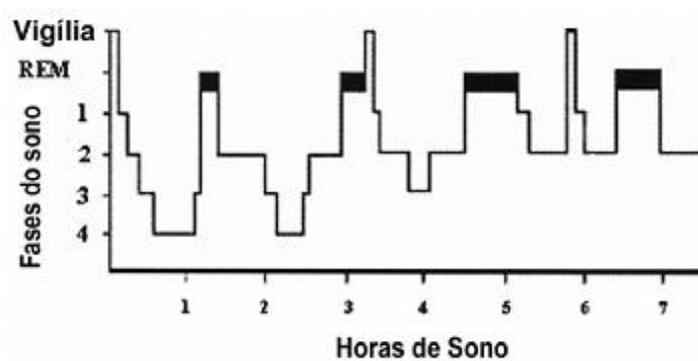


Figura 1 - Representação de um hipnograma obtido durante uma noite inteira de sono (PALMA et al., 2007).

A quantidade ideal de horas de sono varia em cada pessoa. Em geral, a média da população adulta necessita de 7 a 8 horas de sono diárias. Já as crianças possuem um período de sono mais prolongado variando de 9 a 11 horas de sono. Se elas não dormem o suficiente isso pode acarretar em irritação, comprometimento de seu crescimento (devido à diminuição do GH), do aprendizado e da concentração (CRONFLI, 2002).

A secreção do fator de liberação da corticotrofina (CRF), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o cortisol ou corticosterona, a noradrenalina e a adrenalina (Figura 2), relacionam-se também com o ciclo sono-vigília, mas é principalmente controlada pelo ritmo circadiano (PALMA et al., 2007).

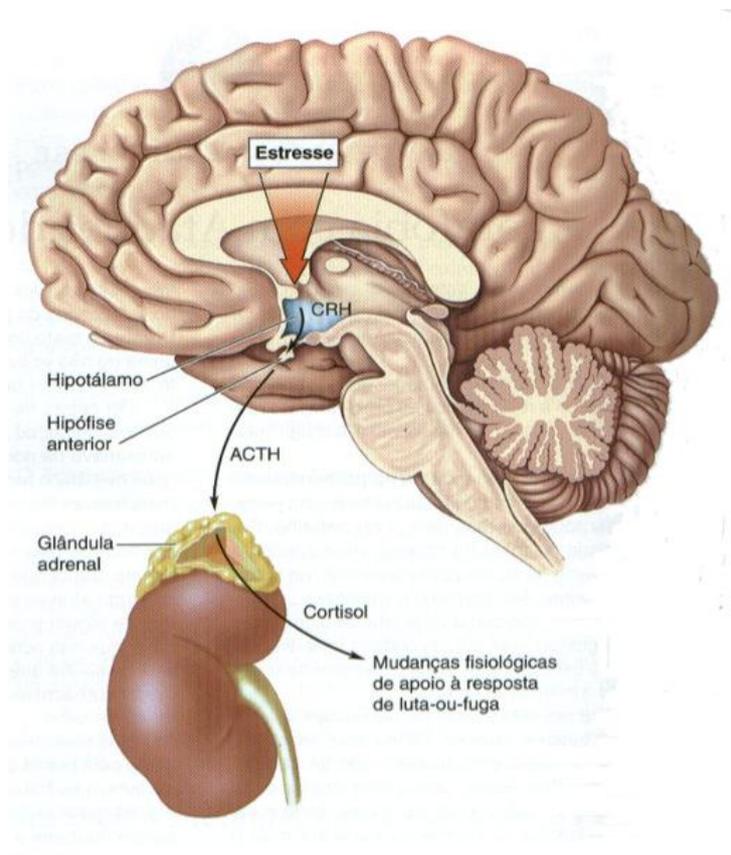


Figura 2 – Esquema da liberação do cortisol pelas supra-renais através da ativação do eixo HPA.

Dessa forma, o pico da atividade do eixo HPA e do sistema nervoso autônomo simpático ocorre pouco tempo antes do período ativo e o momento de menor atividade é observado pouco antes do sono (BORN & FEHM , 2000), (Figura 3). Assim, uma boa qualidade do sono é vital para que o sistema seja ativado quando necessário, mas tão importante quanto é que o sistema seja desativado assim que a situação de estresse esteja controlada, através da secreção do glicocorticóide cortisol (em primatas e seres humanos) ou corticosterona (em roedores) (PALMA et al., 2007).

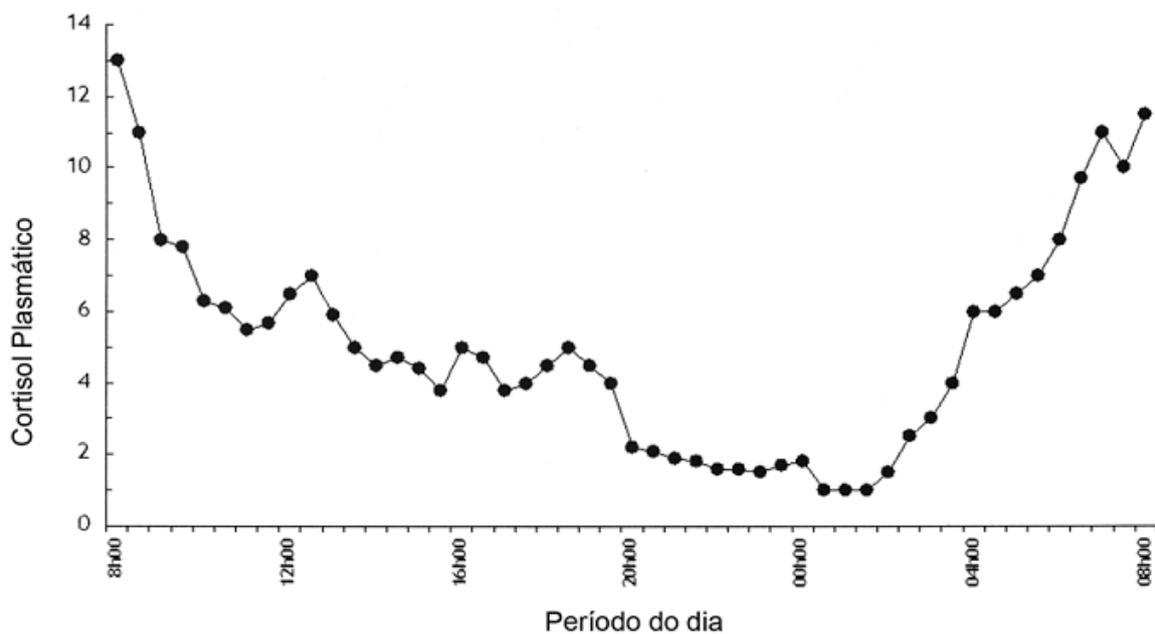


Figura 3 - Padrão característico da secreção diária de cortisol em um indivíduo saudável (PALMA et al., 2007).

As Fases do Sono (CRONFLI, 2002):

- ✚ **Sono Não-REM (Fase 1)** - Melatonina é liberada, induzindo o sono (sonolência).
- ✚ **Sono Não-REM (Fase 2)** – Diminui o ritmo cardíaco e respiratório (sono leve), relaxam-se os músculos e cai a temperatura corporal.
- ✚ **Sono Não-REM (Fases 3 e 4)** - Pico de liberação do GH e da leptina (sono profundo). O cortisol começa a ser liberado até atingir seu pico, no início da manhã.
- ✚ **Sono REM** - É o pico da atividade cerebral, quando ocorrem os sonhos. O relaxamento muscular atinge o máximo, voltam a aumentar as frequências cardíaca e respiratória.

O ciclo sono–vigília também é regulado pela secreção de melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina). Ela é sintetizada pela glândula pineal através da conversão do triptofano em serotonina e esta em melatonina (CLAUSTRAT et al., 2005). Sua secreção ocorre exclusivamente à noite, iniciando-se cerca de 2 horas antes do horário habitual de dormir, induzindo o sono (DAWSON & ARMSTRONG, 1996; LACK & WRIGHT, 2007) e atingindo níveis plasmáticos máximos entre 03:00 e 04:00 horas (CLAUSTRAT et al., 2005). Depois de secretada, se distribui por vários tecidos corporais e não é estocada, sendo metabolizada pelo fígado (REITER, 1991). Ela apresenta alta solubilidade em lipídeos, o que facilita sua passagem através das membranas celulares (CLAUSTRAT et al., 2005; PARDRIDGE & MIETUS, 1980).

A sonolência e diminuição da temperatura corporal estão intrinsecamente relacionadas com o aumento da concentração de melatonina (DIJK & CAJOCHEN, 1997; STRASSMANN et al., 1991). A teoria mais aceita é que a melatonina induz o sono através da vasodilatação o que provoca a redução da temperatura corporal, e também por atuar nos centros do sono do hipotálamo (VAN SOMEREN, 2000).

Estima-se que cerca de 16 a 40% da população sofra de algum distúrbio do sono (INSTITUTO DO SONO). Devido a isto estudos relacionados com o sono ou a falta dele são de extrema importância já que o sono é responsável por inúmeras funções que contribuem para a regulação da homeostase do organismo.

A restrição do sono pode ser entendida, portanto, como a falta da quantidade de sono necessária por uma pessoa. Ela pode ocorrer devido a uma duração do sono insuficiente (privação de sono quantitativa), a um período sono fragmentado (privação de sono qualitativa) ou uma combinação dos dois fatores (MALIK & KAPLAN, 2005).

Distúrbio ou perda de sono é um problema comum nos dias atuais (MIZOGUCHI et al., 2002). O tempo médio disponível para uma noite de sono esta diminuindo na população humana como consequência de uma maior demanda do estilo de vida (RAJARATNAM & ARENDT, 2001). A perda de sono, que resulta do aumento da carga de trabalho, turno de trabalho e várias outras mudanças impostas pela sociedade moderna podem representar uma séria ameaça para a saúde e bem estar (CIRELLI, 2006).

O sono tem importantes funções homeostáticas, e a RS é um estressor que traz consequências para o cérebro, bem como os vários sistemas corporais (McEWEN, 2006). Ela é considerada um fator de risco que leva ao aparecimento de diversas doenças. Distúrbios do sono são responsáveis por prejudicar as funções metabólicas e endócrinas, bem como causar uma diminuição do peso corporal apesar do aumento da ingestão de comida em alguns indivíduos (ANDERSEN et al., 2005), inicial hipertermia seguida de hipotermia (EVERSON et al., 1989), aumento nos níveis de ansiedade (OBERMEYER et al., 1991), diminuição da atividade locomotora, irritabilidade (SILVA et al., 2004), baixo rendimento (ANDERSEN et al., 2000) e enfraquecimento do sistema imunológico (McEWEN, 2006).

Estudos prévios também mostram que a RS leva a danos comportamentais (RIAL et al., 2007; SUCHECKI et al., 2002), hormonais (RIAL et al., 2007; SUCHECKI et al., 2002; KNUTSON ET AL., 2007) e alterações neuroquímicas (STEIGER, 2007; SEI et al., 2000) nos animais. Outros riscos provocados pela falta de sono a curto prazo são cansaço e sonolência durante o dia, alterações repentinas de humor, perda da memória de fatos recentes, comprometimento da criatividade, redução da capacidade de planejar e executar, lentidão do raciocínio, desatenção e dificuldade de concentração (Mcewen, 2006).

Alem disso, a RS contínua e persistente intensifica o risco a saúde, gera depressão, ansiedade, alterações no humor e psicoses que parecem compor processos patológicos (OBERMEYER et al., 1991; RIAL et al., 2007; SUCHECKI et al., 2002; KNUTSON et al., 2007).

Dados clínicos têm mostrado que a RS provoca déficits de aprendizagem e memória (TILLEY & EMPSON, 1978; HARRISON & HORNE, 2000; MEDNICK et al., 2002). Além disso, numerosos estudos demonstraram que a RS em animais de laboratório produzem perda da memória, em vários modelos comportamentais como nos testes de esquivas (HARRIS et al., 1982; BUENO et al., 1994; SMITH & KELLY, 1998).

Outra característica relacionada com a RS é que ela prejudica a produção e liberação de hormônios. O hormônio do crescimento (GH - Growth Hormone) chega a atingir seu pico máximo na primeira metade do período de sono (JANET et al., 2009), aproximadamente meia hora após uma pessoa dormir. Ele ajuda a manter o tônus muscular, evita o acúmulo de gordura, melhora o desempenho físico e combate a osteoporose. Portanto, durante a RS a liberação de GH é substancialmente prejudicada. A leptina, um hormônio secretado pelos adipócitos que sinaliza a sensação de saciedade para o cérebro, é reduzida na circulação periférica durante a RS aguda (MULLINGTON et al., 2003; SPIEGEL et al., 2004). A grelina, um hormônio que sinaliza fome para o cérebro, está aumentada durante a RS parcial. A combinação da redução do metabolismo produzida pela RS e aumento do apetite possivelmente leva ao ganho de peso e pode contribuir com a obesidade e o desenvolvimento da síndrome metabólica (SPIEGEL et al., 2004). Com a redução das horas de sono, a probabilidade de desenvolver diabetes também aumenta. A falta de sono inibe a produção de insulina pelo pâncreas, além de elevar a quantidade de cortisol, o hormônio do estresse, que tem efeitos contrários aos da insulina, fazendo com que se eleve a taxa de

glicose no sangue, o que pode levar a um estado pré-diabético ou, mesmo, ao diabetes, propriamente dito (CRONFLI, 2002).

Outros hormônios que tem sua produção alterada pela RS são os hormônios da tireóide. O nível do hormônio tireoestimulante (TSH) secretado pela hipófise é elevado durante a RS (PALMBLAD et al., 1979; SADAMATSU et al., 1995). O TSH estimula a tireóide a produzir os hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), que inibem a produção de TSH, fazendo, assim, com que haja sua regulação (mecanismo de feedback); porém, se esta regulação for prejudicada poderá haver uma hiper ou hipofunção da tireóide, o que acarretará em distúrbios das suas funções (PALMBLAD et al., 1979; RADOMSKI et al., 1992).

Um estudo feito com mais de 5500 homens e mulheres, que dormem menos de 6 horas por noite, mostra que eles têm 66% mais chances de desenvolver hipertensão do que indivíduos que dormem de 7 a 8 horas por noite (GOTTLIEB et al., 2005). A curta duração do sono está associada com o aumento do risco de desenvolver futura doença coronariana e o desenvolvimento de diabetes nas mulheres (AYAS et al., 2003) e baixa tolerância a glicose em homens e mulheres (GOTTLIEB et al., 2006). Janet e colaboradores (2009) mostram que a curta duração do sono também está associada à síndrome metabólica em indivíduos entre 30 e 54 anos de idade.

Recentes estudos mostram que a RS por 72 horas elevou os níveis de corticosterona e provocou uma redução significativa no número de novas células cerebrais produzidas no hipocampo (região do cérebro ligada à

formação de novas memórias) (GUZMAN-MARIN et al. 2007). A Corticosterona é um hormônio da classe dos glicocorticóides liberado pelo córtex das adrenais de animais e é o principal indicativo de estresse, uma vez que o estresse aumenta a produção de corticosteróides.

A atividade do eixo HPA é governada pela secreção do hormônio liberador de corticotropina e vasopressina pelo hipotálamo, os quais, por sua vez, ativam a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela pituitária, que finalmente estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal (NEMEROFF, 1996). Os glicocorticóides interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição negativa por feedback da secreção do ACTH pela pituitária e do CRF a partir do hipotálamo. Embora os glicocorticóides regulem a função de quase todos os tecidos do corpo, o efeito fisiológico mais conhecido desses hormônios é a regulação do metabolismo energético. Uma de suas principais tarefas é aumentar a glicose no sangue para fornecer energia aos músculos e nervos.

O estresse induzido pela RS também altera a concentração do neurotransmissor GABA (Ácido γ -Aminobutírico) nos animais, sugerindo um papel do mecanismo GABAérgico nas mudanças induzidas pela RS, nas alterações comportamentais e dano oxidativo nos animais (KALONIA & KUMAR, 2007). Ele é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) e está distribuído irregularmente no cérebro com alta densidade no córtex frontal, hipocampo e cerebelo (PAREDES & AGMO, 1992; RABOW et al., 1995). Diversas regiões moduladoras são identificadas no complexo

receptor $GABA_A$, incluindo benzodiazepinas, barbitúricos e esteróides (PAREDES & AGMO, 1992; RABOW et al., 1995). Há grandes evidências que sugerem que o estresse e possivelmente a ansiedade podem afetar o sistema GABA. Desta forma pode-se dizer que a RS é um estressor que leva a alterações metabólicas e endócrinas relevantes, que podem trazer riscos para a saúde física e mental do ser humano.

1.2 - O estresse oxidativo (EO)

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular (GUTTERIDGE, 1993; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1991). Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo, que designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (SIES, 1986).

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo causado por ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) que são radicais livres provenientes do meio ambiente ou gerado pelo próprio organismo. Entre as biomoléculas alvo dessas espécies encontram-se as que compõem membranas celulares, proteínas, DNA e RNA. O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992). São estes elétrons não emparelhados da última camada que conferem alta reatividade a esses átomos ou moléculas.

Neste estudo foi analisada a geração de estresse oxidativo sistêmico e cerebral. Para se avaliar o estresse sistêmico foi utilizado o sangue, sendo este dividido em plasma e eritrócitos. As hemácias constituem bons modelos experimentais para o estudo dos mecanismos de lesão oxidativa provocados

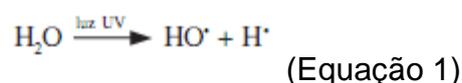
por radicais livres em biomembranas, pois são susceptíveis ao estresse oxidativo (ZOU et al. 2001). A integridade das hemácias reflete o grau das alterações sistêmicas ocorridas dentro de um organismo. A perda da capacidade da hemácia de moldar-se dentro do vaso sanguíneo é resultado da lipoperoxidação de sua membrana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Já o cérebro é sensível ao dano oxidativo devido a uma abundante presença de ácidos graxos poliinsaturados, uma deficiente defesa antioxidante, grande utilização de oxigênio devido ao seu alto metabolismo, alta concentração de metais de transição, como cobre e ferro, em diversas regiões os quais participam da reação de Fenton formando radical hidroxila (HALLIWELL et al., 1992; DRINGEN et al., 2005). A reação dos radicais livres com as estruturas celulares de diversos sistemas e órgãos ocorre de maneira diferente dependendo do tecido analisado.

As principais ERO são: hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (HALLIWELL, 1999). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem ser geradores de novos radicais.

1.3.1 - Radical hidroxila (OH[•])

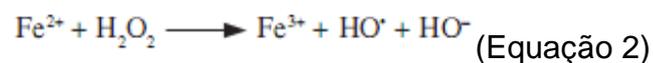
É considerada a ERO mais reativa em sistemas biológicos, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. A combinação extremamente rápida do OH[•] com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se a hidroxila for produzida próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, a hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986).

O radical HO[•] é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H₂O₂ com metais de transição e hemólise da água por exposição à radiação ionizante (Equação 1) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1992). O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares como, por exemplo, a membrana do núcleo. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical HO[•] em seu interior (HUSAIN et al., 1987).



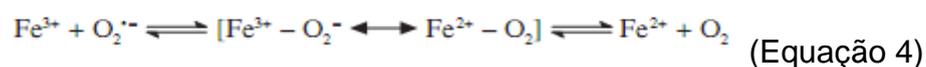
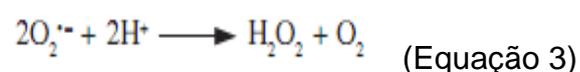
Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são Cu¹⁺ e Fe²⁺. Nesse sistema, a importância do

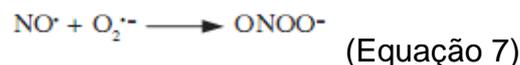
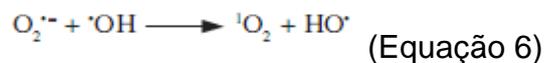
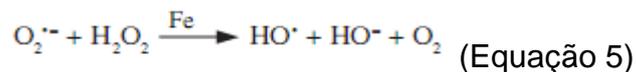
ferro é mais pronunciada devido a sua maior biodisponibilidade e, no organismo, na maior parte do tempo ele encontra-se complexado com proteínas de transporte (ex. transferrina), e armazenamento (ex. ferritina e hemosiderina). A reação do Fe^{2+} com o H_2O_2 (reação de Fenton) pode ser vista a seguir (Equação 2):



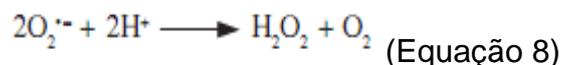
1.3.2 - Ânion Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$)

O radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) ao contrário da maioria dos radicais livres é inativo. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (Equação 3). O radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) participa de certos processos químicos importantes no contexto biológico. O principal deles é auxiliar na produção de radical HO^\bullet , através da redução de quelatos de Fe (III) (Equação 4), formando Fe^{+2} . Assim, o HO^\bullet pode ser obtido através da reação de Haber-Weiss (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1992; KEHRER, 2000) (Equação 5). O radical ânion $\text{O}_2^{\bullet -}$ também reage com o radical HO^\bullet produzindo oxigênio singlet $^1\text{O}_2$ (Equação 6) e com o óxido nítrico (NO^\bullet) produzindo peroxinitrito (ONOO^-) (Equação 7).





Além disso, o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ presente no organismo é eliminado pela enzima superóxido dismutase, que catalisa a dismutação de duas moléculas de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Equação 8). Este último, quando não eliminado do organismo pelas enzimas peroxidases e catalase, pode gerar radicais hidroxila (HALLIWELL et al., 2000), como descrito anteriormente. Apesar destes efeitos danosos, o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. O radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ é gerado, *in vivo*, por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos.

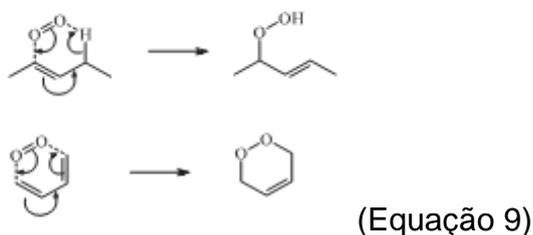


1.3.3 - Oxigênio singlet (${}^1\text{O}_2$)

A forma mais deletéria do oxigênio ao organismo é o oxigênio singlet (${}^1\text{O}_2$), pois é a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do O_2 em organismos vivos. O seu tempo de meia-vida depende muito do meio onde se encontra. Em meio aquoso, sua meia-vida é muito pequena, pois ele se choca

com as moléculas de H₂O transferindo sua energia, desativando-se. Porém, em meio orgânico, a meia-vida do oxigênio singlet é maior e, portanto, pode causar algumas reações químicas com determinados aceptores por incorporação do O₂.

O oxigênio singlet reage com algumas classes de biomoléculas e, em geral, essas reações são do tipo eno e dieno (reações de Diels-Alder) (Equação 9). Os compostos naturais mais reativos frente ao ¹O₂ são os carotenóides, devido às múltiplas insaturações conjugadas. Assim, o ¹O₂ reage mais lentamente com os ácidos graxos que com o β-caroteno, e quanto maior o número de insaturações presentes nos ácidos graxos, mais rapidamente eles irão reagir (LARSON, 1997).



1.3.4 - Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila. Ele somente oxida proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, GSH por exemplo. O H₂O₂ é gerado, *in vivo*, pela dismutação do radical ânion

superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por enzimas oxidases ou pela β -oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias são importantes fontes de $O_2^{\cdot-}$ e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em superóxido dismutase (SOD) que o converte em H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio gerado é então parcialmente eliminado por catalases, glutathione peroxidase e peroxidases ligadas à tioredoxina, mas como essa eliminação tem baixa eficiência, grande parte do H_2O_2 é liberado para a célula (HALLIWELL & CLEMENT, 2000).

O H_2O_2 é utilizado pelos fagócitos na produção de ácidos hipoalogenosos, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos, mas que por outro lado apresentam efeitos deletérios quando expostos às moléculas biológicas (VOGT, 1995; HALLIWELL & CLEMENT, 2000).

1.3.5 - O óxido nítrico (NO)

O NO é um radical livre gasoso, inorgânico, incolor, que possui um elétron desemparelhado (BECKMAN & KOPPENOL, 1996). Ele também é considerado um mensageiro intercelular no cérebro e tem um papel crucial em diversos processos fisiológicos e patológicos (CAHUANA et al., 2004; GOW et al., 2004). Furchgott e Zawadski (1980) descobriram os efeitos do NO e desde então ele tem sido alvo de várias pesquisas.

A síntese do NO resulta da oxidação da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MARLETTA, 1993; MONCADA, et al. 1991). A NOS possui isoformas que são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva, dependente de íons cálcio (cNOS, nNOS ou NOS I, eNOS ou NOS III), que estão envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS ou NOS II), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MARLETTA, 1994; MONCADA, et al. 1991).

Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina. O principal deles é o N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Este análogo compete com a L-arginina e age como inibidor estereoespecífico da NOS (MONCADA et al. 1991; REES et al., 1990). Outro inibidor importante é a aminoguanidina que também é capaz de inibir a NOS e apresenta uma relativa seletividade para i-NOS (SZABÓ, 1995).

O óxido nítrico não é suficientemente reativo, mas pode reagir com o radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ gerando peroxinitrito ($ONOO^-$). Esse último, por sua vez, pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos (HALLIWELL, 1999; HALLIWELL & CLEMENT, 2000; EISERICH et al., 1996).

1.3.6 - Estratégias da defesa antioxidante

“Antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES & STAHL, 1995).

Devido à produção diária de radicais livres durante os processos metabólicos o organismo precisou desenvolver mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares de espécies reativas e impedir a lesão celular (SIES, 1993). Portanto, os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Eles podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos:

- 1) Antioxidantes enzimáticos:** superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutatona peroxidase, enzimas de reparo.
- 2) Antioxidantes não enzimáticos:** α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, Ácido ascórbico (vitamina C), Flavonóides, Proteínas do plasma, Selênio, Glutaciona, L-cisteína.

Para manter a homeostase, é essencial o equilíbrio entre a geração de agentes pró-oxidantes e o sistema de defesa antioxidante. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA. Os antioxidantes também agem reparando as lesões causadas pelos

radicais, através da remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas.

Para este estudo o antioxidante analisado foi a Glutathione (GSH, γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine). Ela é um tripeptídeo e existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Ela está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular ((MEISTER & ANDERSON, 1983). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (MEISTER & ANDERSON, 1983).

1.3 A RS e o estresse oxidativo (EO)

Diversos estudos mostram que a RS gera EO, o que resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem levar ao dano neuronal e celular (GOPALAKRISHNAN et al., 2004). Os radicais livres iniciam uma cascata de reações causando lipoperoxidação (LP), danos no DNA, morte celular e problemas neurológicos. A RS também enfraquece as defesas antioxidantes por alterar o balanço entre a geração de oxidantes e antioxidantes (GOPALAKRISHNAN et al., 2004; RAMANANTHAN et al., 2002; KUMAR e KALONIA, 2007; KALONIA e KUMAR, 2007).

Estudo anteriores que verificaram o EO em regiões específicas do cérebro indicam que a restrição do sono REM pode produzir alterações oxidativas como diminuição nos níveis de glutatona no hipocampo e tálamo (D'ALMEIDA et al. 1998), bem como a diminuição da atividade da superóxido dismutase no hipocampo e tronco cerebral como foi mostrado por Ramanathan et al. (2002).

De acordo com Reimund (1994), os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio produzidas durante a vigília, são removidos durante o sono. Para este autor, o sono tem uma função antioxidante e a RS estaria associada a um acúmulo de radicais livres. Dados que corroboram com este autor mostram que a melatonina é um eficiente antioxidante atuando como potente sequestradora de espécies reativas (TAN, et al.,1993). É possível encontrar na literatura, em estudos realizados *in vivo*, que a melatonina é cinco vezes mais efetiva que a vitamina E para detoxificar OH e duas vezes mais eficaz para neutralizar o

radical peroxil (LOO⁻). Estudos anteriores relatam que uma molécula de melatonina pode sequestrar quatro ou mais espécies reativas tornando-se o mais potente protetor tissular. Esta informação torna-se relevante, pois a melatonina pode auxiliar o tratamento de outras patologias como Mal de Alzheimer e Parkinson (PIERI et al., 1994; REITER et al., 2002; TAN et al., 2002; PAPPOLLA et al., 2001).

A proposta deste estudo foi contribuir para o entendimento sobre a participação do estresse oxidativo nas alterações ocorridas durante o processo de restrição aguda de sono, pois embora existam trabalhos que apontem para a participação dos radicais livres na mediação neste processo, existe a necessidade da caracterização destas moléculas por métodos mais sensíveis.

1.4– O Labirinto em cruz elevado (LCE)

Vários modelos animais foram desenvolvidos para se estudar processos emocionais relacionados com o medo e a ansiedade. Um dos modelos animais de ansiedade mais eficiente e amplamente utilizado é o chamado “Labirinto em Cruz Elevado”.

Handley & Mithani (1984) foram os precursores desta técnica que foi comportamental e farmacologicamente legitimado por Pellow e colaboradores (1985). Ela consiste de um labirinto que fica elevado a 50 cm do chão e que possui dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 50 cm) como mostra a figura 6. O comportamento do rato no labirinto é avaliado durante 5 minutos através do armazenamento de imagens feito por uma filmadora fixa no teto da sala ou através da observação direta por um monitor. Os dados coletados podem ser quantificados através de programas de computador especiais. Para este estudo o programa utilizado foi o X-Plo-Rat 2005 versão 1.1 desenvolvido por uma equipe da Universidade de São Paulo – USP. Tais programas determinam o tempo em que o rato permanece em cada braço, além da frequência com que o animal entra nos braços abertos e fechados. Outro parâmetro avaliado é a atividade motora do animal através do número de cruzamentos feitos em cada braço.

O LCE foi desenvolvido inicialmente para avaliar o efeito de drogas ansiolíticas incluindo os benzodiazepínicos, barbitúricos e etanol bem como agentes ansiogênicos. As observações revelam que animais tratados com drogas ansiolíticas aumentam o número de entradas e permanência nos braços

abertos enquanto que os tratados com drogas ansiogênicas produzem um efeito oposto, evitando entrar nestes braços.

Por que utilizar o LCE? O teste do LCE possui diversas vantagens em relação a outros testes: (1) o procedimento do teste é rápido e simples e não é necessário utilizar nenhum equipamento de alto custo; (2) ele é baseado no comportamento espontâneo, desta forma não é preciso o treinamento do animal, nem o uso de estímulos nocivos como o choque elétrico; (3) ele é capaz de identificar o efeito de drogas ansiolíticas e ansiogênicas, sendo, portanto um teste expressivo para determinar o comportamento de ansiedade (PELLOW ET AL., 1985).

Apesar de o labirinto em cruz ser amplamente utilizado, este teste por si só pode ser um indutor de estresse não detectado na avaliação do comportamento animal dentro do labirinto, mas que pode ser verificado sistemicamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a geração do estresse oxidativo cerebral e sistêmico em ratos submetidos à restrição aguda de sono e ao labirinto em cruz elevado.

2.2 Estratégias experimentais:

- ✚ Avaliar se 72h de restrição de sono gera o estresse oxidativo sistêmico e cerebral.
- ✚ Avaliar a influência do teste do labirinto em cruz elevado na geração do estresse oxidativo sistêmico e cerebral.
- ✚ Verificar o comportamento do rato restrito de sono por 72h dentro do labirinto em cruz elevado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e reagentes

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 200-250g. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina-PR, dentro de gaiolas coletivas contendo no mínimo 3 e no máximo 5 animais, com alimentação especial para ratos e água *ad libitum* e ciclo de 12 horas de claro/escuro.

Os reagentes utilizados neste estudo foram:

- ✚ 2,2-azo-bis-2-amidinopropano diidroclorido (ABAP) (Aldrich);
- ✚ Albumina sérica bovina (SAB) (Sigma);
- ✚ DTNB (Sigma);
- ✚ EDTA (Sigma);
- ✚ Reagente fenólico de Folin-Ciocalteus (Merck);
- ✚ Glutathiona reduzida (Sigma);
- ✚ KCl (Reagen Quimibrás);
- ✚ KH_2PO_4 (Merck);
- ✚ Heparina (Heparina sódica 5000UI/mL Hipolabor);
- ✚ H_2O_2 (Synth);
- ✚ Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinadiona) (Sigma);
- ✚ Na_2HPO_4 (Merck);
- ✚ TCA (Sigma);
- ✚ Tert-butil hidroperóxido (Sigma);
- ✚ Tris (Sigma);

✚ Trolox (Aldrich).

3.2 Delineamento experimental

Para dar início aos trabalhos os ratos (n=64) foram divididos em quatro grupos experimentais: (1) o grupo controle, (2) o grupo submetido ao LCE, (3) o grupo RS por 72 Hs e (4) o grupo RS por 72 Hs que foi submetido ao LCE. Os três primeiros foram sacrificados e posteriormente realizadas as análises de estresse oxidativo com as amostras coletadas. O quarto grupo apenas foi submetido ao LCE para verificar se ocorreram alterações comportamentais após a RS.



Figura 4 - Delineamento experimental com as divisões dos grupos experimentais.

3.3 72 horas de RS

Para manter os animais restritos de sono por 72h foi utilizado o método da plataforma submersa descrito por SUCHECKI et al. (1998) com algumas modificações. O método consiste em colocar os ratos (oito animais por experimento), anteriormente pesados, em plataformas individuais de 20 cm de altura por 10 cm de diâmetro. As plataformas são inseridas dentro de uma caixa plástica contendo água, que fica 1 cm abaixo da superfície das plataformas. Devido à pequena área da plataforma, os ratos não possuem espaço suficiente para se acomodarem para dormir, assim eles precisam permanecer em estado de vigília para não caírem na água. Eles foram mantidos no ciclo de claro/escuro de 12 horas com comida e água fornecidas *ad libitum* (Figura 5 B).

As caixas permaneciam dentro do biotério do departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento – PGAC, pois as análises comportamentais foram realizadas neste local. Os grupos controles também foram acondicionados dentro das mesmas caixas contendo cepilho por 72h no biotério da PGAC devido as análise comportamentais realizadas no LCE (Figura 5 A).

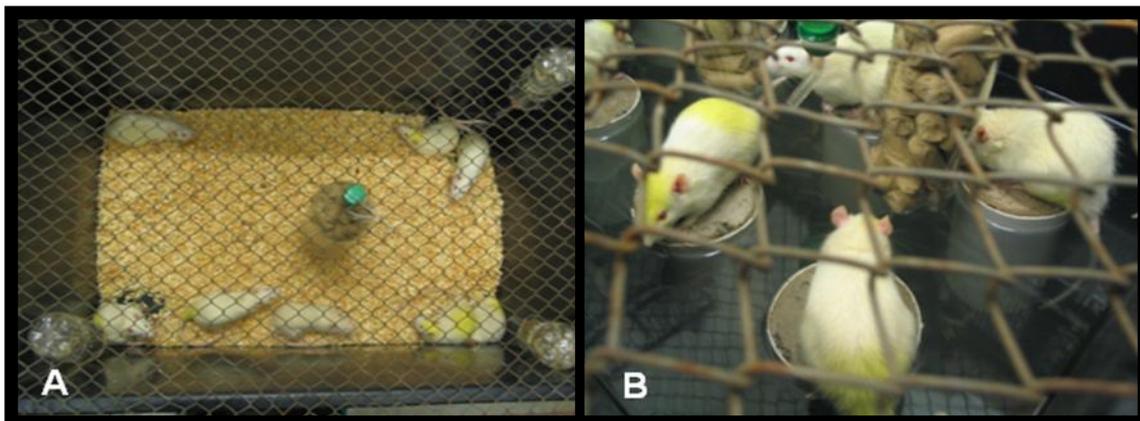


Figura 5 - A) Ratos do grupo controle. B) Ratos do grupo RS por 72h. Nesta imagem é possível verificar a plataforma submersa com o nível da água ficando 1 cm abaixo da superfície da plataforma.

3.4 Análise comportamental no teste do LCE

O teste do LCE desenvolvido por Pellow et al. (1985), descrito anteriormente, é um teste comportamental inicialmente desenvolvido para testar o efeito de drogas ansiolíticas e ansiogênicas. Para esse estudo este método foi utilizado para verificar se 72h de RS altera o comportamento do animal dentro do labirinto.

Antes de iniciarem os testes no LCE dos animais RS por 72 Hs, os oito animais foram retirados das plataformas submersas e colocados em uma gaiola contendo cepilho onde permaneceram por aproximadamente 10 minutos até começar os testes. O último animal aguardou na gaiola 40 minutos até ser submetido ao LCE. O mesmo ocorreu com o grupo que apenas foi submetido ao LCE.

O LCE fica elevado a 50 cm do piso com dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois fechados (50 x 10 x 50). Neste teste, o animal foi colocado

individualmente no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados, podendo optar por explorar qualquer um dos braços de maneira espontânea e independente. A locomoção do animal foi avaliada durante 5 minutos, e durante esse período verificou-se o número e frequência de entradas em cada braço do labirinto e o total de cruzamentos feitos, bem como parâmetros relacionados com a atividade exploratória/locomotora do animal como ato de levantar (comportamento exploratório em que o animal estende acima seu corpo e patas dianteiras, apoiado sobre as traseiras), esticar (postura em que o animal se estende cautelosamente adiante, sem, no entanto, retirar do lugar suas patas traseiras, voltando em seguida, à mesma posição), auto-limpeza e abaixar a cabeça (movimentos exploratórios de cabeça e ombro abaixo do chão dos braços abertos).

O labirinto é limpo com solução de álcool 5% após a observação de cada animal. A sala onde é realizado o teste permanece com a luz constantemente acesa e ausente de figuras nas paredes ou barulhos que possam interferir no comportamento do animal durante o teste. Todo o procedimento foi filmado através de uma filmadora (SONY DCR-SR 85 – 60 GB Handycam) fixa no teto da sala para posteriores análises feitas no programa X-Plo-Rat 1.1.



Figura 6 - Imagem do labirinto em cruz elevado (LCE). É possível observar os dois braços abertos e os dois braços fechados.

3.5 Análise do índice de massa corporal (IMC)

O peso dos ratos foi verificado antes do início dos experimentos e antes de serem sacrificados para avaliar se a RS altera o peso dos animais. O índice de massa corporal perdida foi analisado através da fórmula:

$$\text{IMC\%} = \frac{\text{Massa inicial RS} - \text{Massa final RS} + \text{Ganho Massa CTL}}{\text{Massa inicial RS} + \text{Ganho Massa CTL}}$$

3.6 Processamento das amostras

3.6.1 Coleta das amostras

Após a RS e/ou os testes no LCE os animais foram pesados e imediatamente sacrificados para posteriores análises do estresse oxidativo. Os

animais foram sacrificados por decapitação utilizando-se uma guilhotina (Insight). O sangue foi coletado em tubos de ensaio previamente heparinizados. O cérebro foi removido, lavado com KCL 1,15% (para remoção de sangue e impurezas), o cerebelo foi retirado, e os hemisférios foram separados e armazenados em microtubos no freezer -86°C (Indrel Ultra Freezer -86°C) até o momento de serem utilizados no o preparo do homogenato.

3.6.2 Preparação das amostras de sangue

O sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 630 x g, durante 5 minutos, a 4°C. O plasma foi separado em microtubos e armazenado no freezer -86C. A papa de hemácias restante foi lavada com NaCl em três ciclos e acondicionada em banho de gelo.

3.6.3 Preparação das amostras de cérebro

Um hemisfério cerebral previamente coletado foi descongelado em banho de gelo. Em seguida foi pesado e inserido no van Potter para a preparação do homogenato.

3.7 Descrição das técnicas para os ensaios de estresse oxidativo

3.7.1 Ensaio de quimiluminescência (QL) induzida por Tert-butil-hidroperóxido (t-butil) no cérebro de ratos.

Para verificar o estresse oxidativo do cérebro foi feita a análise da lipoperoxidação do tecido pelo método da QL, descrito por Flecha (1991). O t-butil inicia uma reação de lipoperoxidação em cadeia que é mensurada no Luminômetro (Turner Designes TD-20/20) através da emissão de luz.

Na preparação do homogenato de todos os ensaios, apenas um hemisfério cerebral foi utilizado. Ele foi pesado e colocado no van Potter com tampão fosfato monobásico 10 mM pH 7,4 (PBK), que estava no banho-maria a 37°C. Após a homogeneização manual a mistura foi dividida em microtubos e centrifugada a 600 x g, por 10 minutos, a 4°C para a obtenção do sobrenadante que foi colocado em novos microtubos e armazenados no gelo. 38,6 µL de t-butil foram diluídos em 1962 µL de H₂O destilada e colocados em um tubo de ensaio envolvido com papel alumínio para evitar o contato com a luz e armazenado no gelo. Após as diluições, em um microtubo novo, foram colocados 860µL de tampão PBK + 120µL do sobrenadante de 40mg/mL que permaneceram em banho-maria por 5 minutos. Após esse período adicionou-se 20µL de t-butil e então foi realizada a leitura no luminômetro (Glomax 20/20 Luminometer) durante uma hora.

3.7.2 Ensaio de quimiluminescência (QL) induzida por Tert-butil-hidroperóxido (t-butil) na hemácia e plasma de ratos.

Cerca de 30µL da papa de hemácia previamente lavada foi diluída em 3 mL de tampão fosfato monobásico 10 mM pH 7,4 (PBK), que estava no banho-maria a 37°C. 1 mL esta suspensão foi diluída novamente em 12,3 mL de

tampão PBK (volume final 13,3mL) e transferido 1 mL desta solução para um microtubo seguido de incubação por 5 minutos. Passado esse período 10 µL de t-butil foi adicionado e realizado a leitura no luminômetro (Glomax 20/20 luminometer) durante uma hora.

Na QL de plasma, a amostra armazenada no freezer -86C foi previamente descongelada no banho de gelo. Em um microtubo novo, 125µL de plasma foram adicionados em 865µL de tampão fosfato dissódico (Na_2HPO_4 30 mM, pH 7.4) e colocado em banho-maria por 5 minutos. Decorrido esse tempo, 10 µL de t-butil foi adicionado e realizada a leitura no luminômetro (Turner Designes TD-20/20) durante uma hora.

3.7.3 Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) por quimiluminescência do cérebro e plasma de ratos.

A técnica TRAP descrita por Repetto et al., 1996 é utilizada para verificar principalmente os níveis dos antioxidantes de baixo peso molecular em um tecido. O Composto 2,2-azo-bis-2-amidinopropano diidroclorido (ABAP), que é um sistema gerador de radical alcooxil, produz fótons que são captados por um luminômetro. O luminol é utilizado nesta reação para amplificar a emissão desses fótons. Essa reação é inibida por análogos da vitamina E e outros antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis.

A primeira curva a ser feita no luminômetro (Turner Designes TD-20/20) é a do ABAP. A segunda curva é a do Trolox (um análogo hidrossolúvel

da vitamina E que tem sua concentração e tempo de indução (TI) conhecidos. As demais curvas são das amostras de cérebro (20 mg/mL) ou plasma (70 µL). Uma comparação do TI depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e amostra permitiu obter os valores de TRAP das amostras em relação ao Trolox.

A fórmula utilizada para o cálculo do TRAP foi:

$$\text{TRAP} = \text{TI da amostra} / \text{TI do Trolox}$$

3.7.4 Avaliação dos níveis de glutathiona (GSH).

A glutathiona é um tripeptídeo que existe sob duas formas no organismo, a forma reduzida (sulfidril) e a oxidada (dissulfato). O GSH é mantido predominantemente, *in vivo*, sob a forma reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase (GSH-Rd). Como a maior parte dos grupos sulfidril não protéicos estão presentes no GSH, a quantificação de tiois solúveis em ácido é empregada na quantificação dos níveis teciduais de glutathiona (Sedlak & Lindsay, 1968).

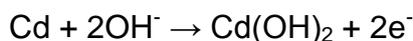
A determinação dos níveis de GSH das amostras de cérebro e hemácia foi realizada espectrofotometricamente. Para a obtenção do sobrenadante de cérebro de 250mg/mL um hemisfério foi pesado e homogeneizado com tampão

glicina e centrifugado a 600xg, a 4°C, durante 10 minutos. Já a papa de hemácia foi hemolisada em H₂O destilada (1:10).

As leituras são realizadas a 412 nm e antes de iniciar as leituras das amostras foi feito a curva de calibração com o padrão de GSH de concentração conhecida.

3.7.5 Determinação do nitrito plasmático e cerebral.

A técnica descrita por Navarro-González e colaboradores (1998) para determinação de nitrito plasmático em soro humano, foi validada e padronizada para camundongos por Panis (2009). Esse método consiste na redução de nitrato a nitrito mediado por reações de oxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente Griess a 550 nm (GRIESS, 1879).



Para avaliar a produção de nitrito das amostras de cérebro (250 mg/mL) e plasma, 60 uL de cada amostra foi desproteinizada e em seguida incubada com esferas de cádmio previamente tratadas com tampão sulfato de cobre 5 mM por 90 minutos. Após esse período foi adicionado reagente de Griess para posterior leitura no espectrofotômetro a 550 nm.

3.8 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados os programas utilizados foram Origin 6.0 e o GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Os resultados apresentam a média \pm SD da média de 6 animais por grupo. A análise de significância foi realizada por teste *t* de Student para dados não pareado no teste do LCE e foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Já os resultados da quimiluminescência foram avaliados por two-way ANOVA.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliações comportamentais no teste do LCE

De acordo com os dados obtidos no LCE a análise do tempo gasto nos braços abertos não foi afetado pela condição grupo ($t [30] = 0,167$; $p = 0,86$) (Figura 7). Isso demonstra que a RS por 72h não provocou a instalação da ansiedade nos ratos, vez que estudos anteriores demonstram que o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos são utilizados como indicador inversamente relacionado com a ansiedade (PELLOW et al., 1985; HOGG, 1996). Quanto maior a exploração nos braços abertos, menor a ansiedade.

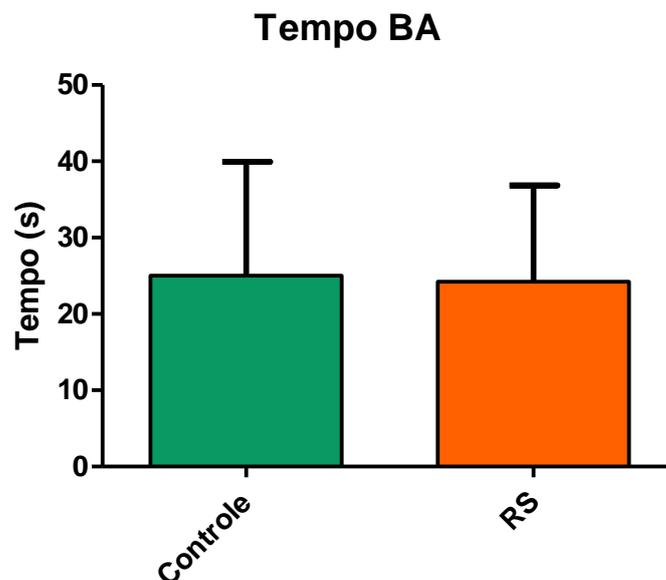


Figura 7 – A avaliação da ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado dos grupos controle e restritos de sono não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($t [30] = 0,167$; $p=0,86$).

Outro parâmetro que indica o comportamento de ansiedade nos ratos é a frequência de entradas nos braços abertos (Figura 8 A). De acordo com o teste estatístico *t* de Student não houve diferenças significativas entre os grupos controle e RS ($t [30] = 0,935$; $p=0,35$). Mais uma vez a RS não alterou o comportamento do animal relacionado com a ansiedade no teste do LCE por 5 minutos.

As análises revelam que a RS influenciou a mobilidade do rato dentro do LCE. Os dados encontrados na figura 8 B sustentam essa idéia já que a frequência de entradas nos braços fechados diminuiu expressivamente no grupo RS por 72h ($t [30] = 2,362$; $p=0,02$).

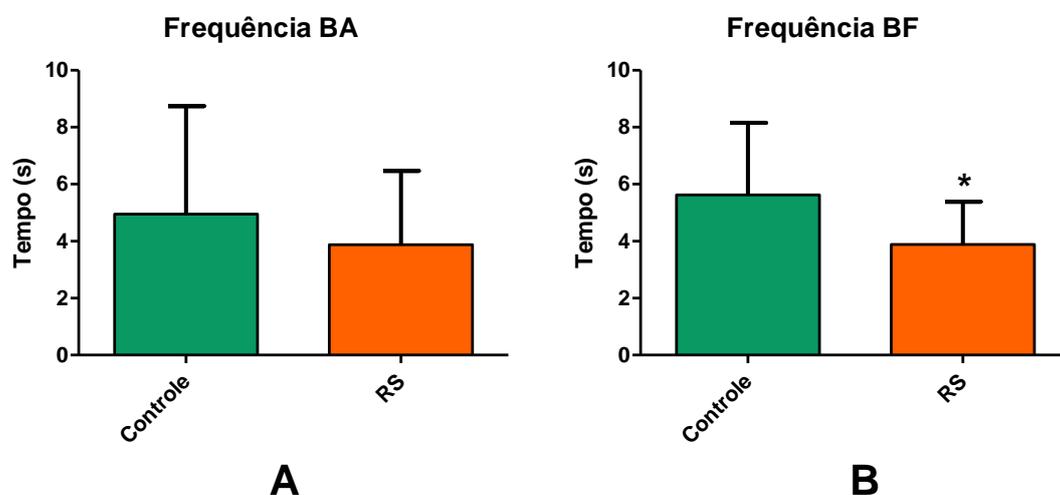


Figura 8 – A análise comportamental no teste do LCE revela que (A) a frequência de entradas nas extremidades dos braços abertos não foi alterada pela RS por 72h ($t [30] = 0,935$; $p=0,35$). No entanto, (B) a RS reduziu a frequência de entradas nas extremidades dos braços fechados ($t [30] = 2,362$; $p=0,02$). Pode-se dizer que a RS aguda não provoca o comportamento de ansiedade nos ratos, mas prejudica sua mobilidade dentro do LCE.

Outros resultados obtidos no teste do LCE corroboram com a figura 8 B. Isto é evidenciado pela redução do total de cruzamentos feitos nos braços fechados pelos ratos RS que podem ser analisados na Figura 9 A ($t [30] = 2,639$; $p=0,01$). E pelo tempo gasto na área central (TAC) observados na Figura 9 B, onde ($t [30] = 3,268$; $p=0,002$). As análises destes parâmetros mostram novamente que a RS prejudicou a exploração do LCE devido à redução do número de cruzamentos feito pelo rato dentro do labirinto.

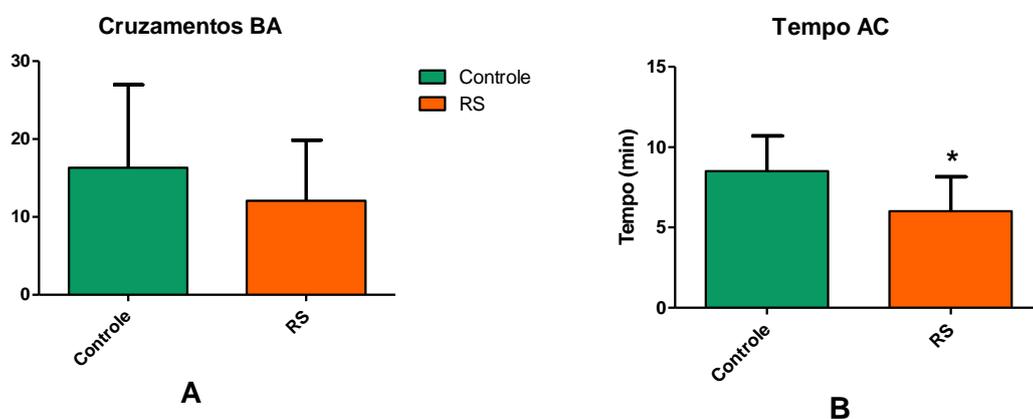


Figura 9 – Análise do teste do LCE. (A) O total de quadrados andados nos braços fechados (ou total de cruzamentos) sofreu reduções significativas após a submissão dos ratos a RS por 72h ($t [30] = 2,639$; $p=0,01$). (B) A RS também reduziu o tempo gasto na área central do LCE ($t [30] = 3,268$; $p=0,002$). Assim pode-se avaliar que a RS está relacionada com perda da capacidade exploratória do rato pela redução da sua mobilidade, pois os ratos RS andaram menos nos braços fechados do LCE em relação ao grupo controle.

Além dos parâmetros citados acima, também foi avaliado o comportamento etológico do rato dentro do LCE. Geralmente esses comportamentos estão relacionados com a exploração do labirinto pelo animal, como a ação de esticar o corpo ou se levantar para avaliar o novo ambiente o qual foi inserido. Na tabela 1 são mostrados quatro comportamentos exploratórios do rato. De acordo com esta tabela houve uma redução da exploração do LCE pelos ratos RS. Apenas a limpeza corporal foi maior no grupo RS, pois eles estavam úmidos no momento do teste.

Tabela 1 – Avaliação dos parâmetros comportamentais analisados no LCE. Os resultados foram expressos pela média \pm DP da duração e frequência do comportamento do rato dentro do LCE durante 5 minutos.

	Controle	RS	Estatística
Abaixar a cabeça			
Duração/min	0,5 \pm 0,3	0,3 \pm 0,1 ^a	t[30]=2,530; p=0,0169
Frequência/min	3,6 \pm 1,8	2,3 \pm 1,0 ^a	t[30]=2,525; p= 0,0171
Esticar o corpo			
Duração/min	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1 ^a	t[29]=2,782; p= 0,0094
Frequência/min	2,2 \pm 1,1	1,7 \pm 0,8	t[29]=1,454; p= 0,1566
Levantar			
Duração/min	0,6 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2 ^a	t[30]=2,828; p= 0,0083
Frequência/min	3,7 \pm 1,4	2,4 \pm 1,3 ^a	t[30]=2,722; p= 0,0107
Limpeza			
Duração/min	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1 ^a	t[30]=2,828; p= 0,0083
Frequência/min	1,4 \pm 0,4	1,8 \pm 0,5 ^a	t[30]=2,499; p= 0,0182

^a Houve diferença estatística de acordo com o teste *t* de Student, quando comparado ao grupo controle.

4.2 Análises do estresse oxidativo no cérebro

4.2.1 Avaliação da lipoperoxidação (LP) pelo método de quimiluminescência (QL) no cérebro de rato.

A QL estimulada por Tert-butil-hidroperóxido do cérebro dos ratos (40mg/mL) indica que os animais submetidos ao LCE por 5 minutos foram os que apresentaram maior lesão oxidativa em relação aos outros grupos ($p < 0,0001$). Em contrapartida, os ratos do grupo RS aparentemente não sofreram lipoperoxidação de suas estruturas celulares em 72h de RS.

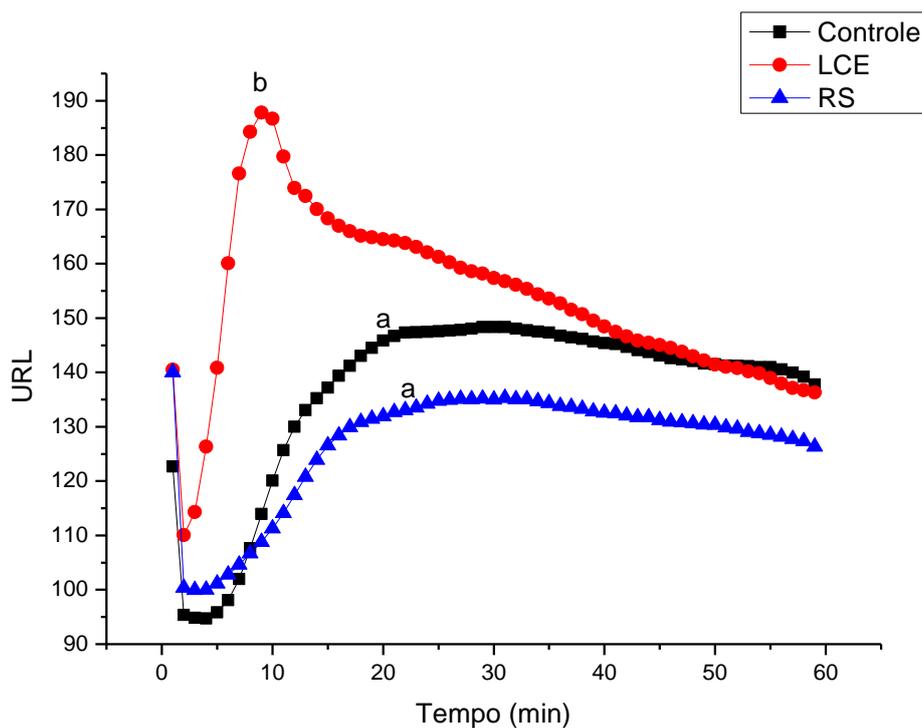


Figura 10 – Avaliação da lipoperoxidação de cérebro de ratos (40mg/mL) por quimiluminescência induzida por tert-butil-hidroperóxido. O grupo submetido ao LCE foi o que apresentou maior lesão oxidativa ($p < 0,0001$). Entretanto a RS por 72 horas não foi suficiente para provocar esse tipo de lesão no cérebro dos ratos. A comparação foi feita pelo teste two-way ANOVA, onde letras iguais representam resultado não significativo e letras diferentes indicam que o resultado foi significativo.

4.2.2 Análise da capacidade antioxidante total (TRAP) por quimiluminescência (QL) do cérebro dos ratos.

Os níveis de TRAP no cérebro (20mg/mL) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Nem o LCE, nem a RS por 72h foram capazes de alterar as concentrações cerebrais de antioxidantes totais.

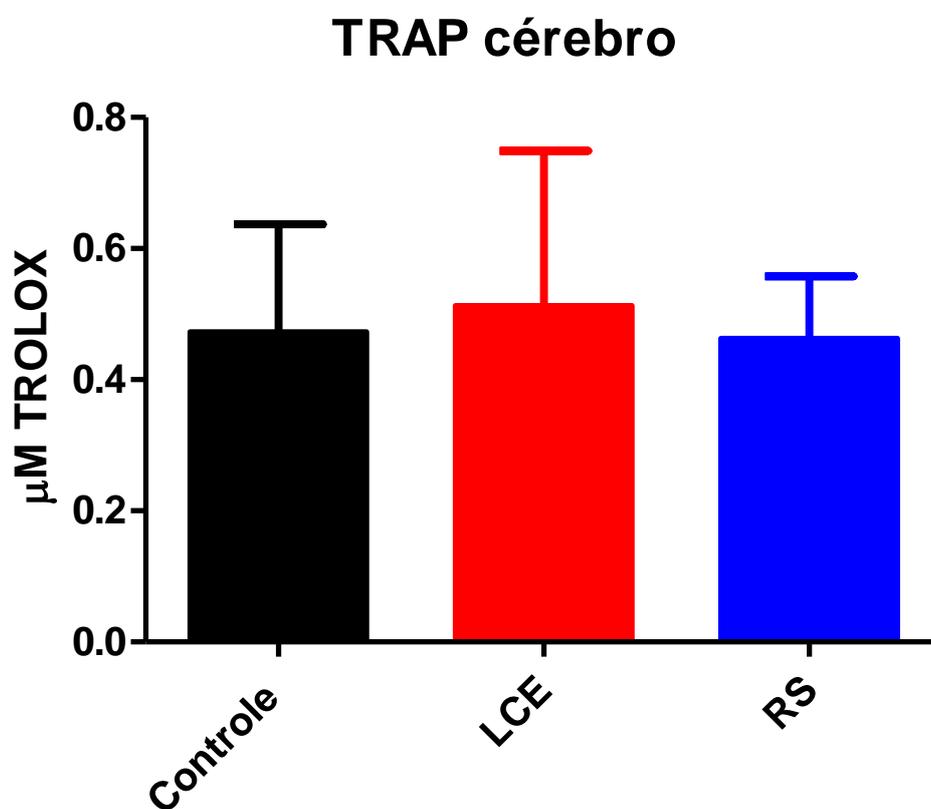


Figura 11 - Análise da capacidade antioxidante total (TRAP) por quimiluminescência do cérebro de ratos. Os níveis de TRAP no cérebro não foram significativamente diferentes entre os grupos.

4.2.3 Avaliação dos níveis de glutathiona (GSH) no cérebro de ratos.

Os resultados expressos na figura 12 indicam os níveis de GSH no cérebro (250mg/mL), onde é possível observar que 5 minutos no LCE e 72h de RS não alteraram a concentração de GSH neste tecido.

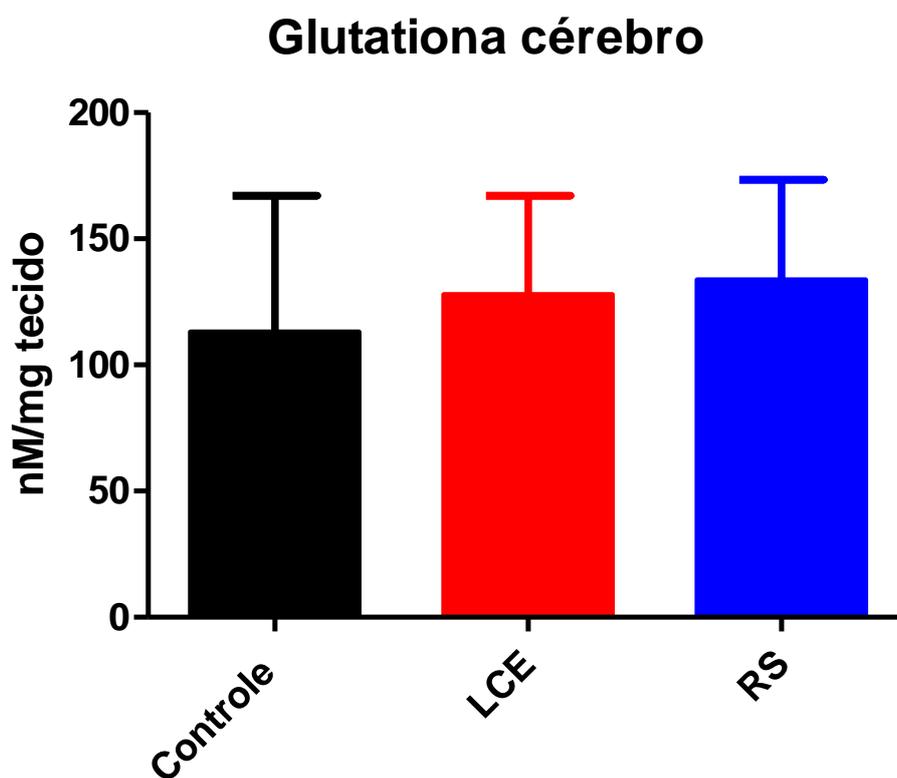


Figura 12 - Avaliação dos níveis de glutathiona (GSH) no cérebro de ratos. Os animais submetidos ao LCE e os animais RS não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de GSH no cérebro.

4.2.4 Determinação da concentração de nitrito pelo método cádmio-cobre no cérebro de ratos.

Na figura 13 é possível observar que o nível de nitrito no cérebro (250mg/mL) dos ratos não foi alterado por 72h de RS ($p < 0,006$). No entanto os animais que passaram pelo teste do LCE durante 5 minutos apresentaram uma redução das concentrações de NO neste tecido.

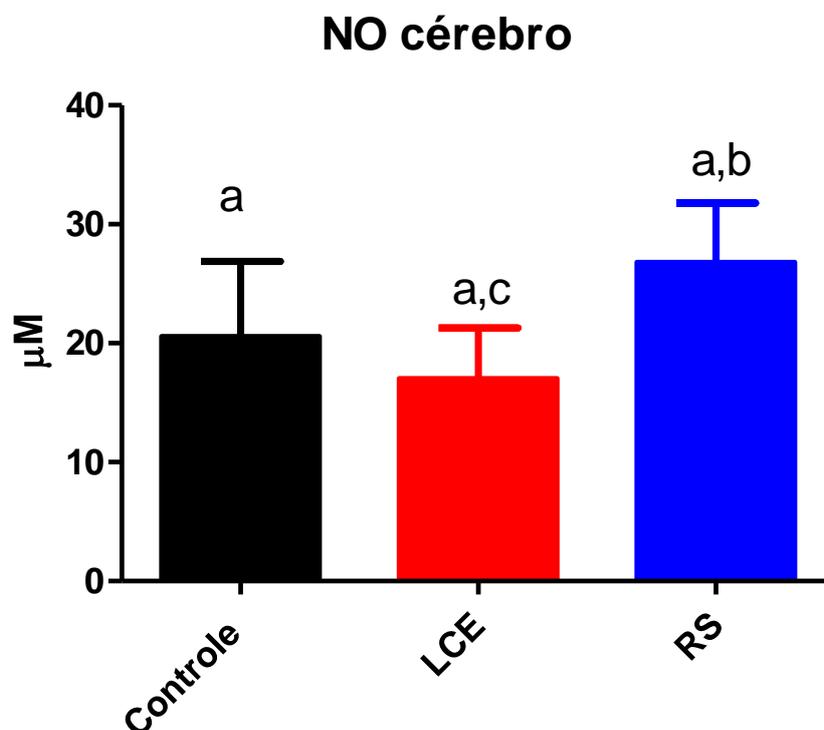


Figura 13 - Determinação da concentração de nitrito cerebral pelo método cádmio-cobre. A RS por 72h não foi suficiente para alterar os níveis de NO cerebral. Entretanto 5 minutos de exposição ao LCE reduziu significativamente a concentração de nitrito no cérebro em relação ao grupo restrito de sono ($p < 0,006$). O teste utilizado foi o one-way ANOVA, onde letras iguais representam resultado não significativo e letras diferentes indicam que o resultado foi significativo.

4.3 Análises do estresse oxidativo no sangue

4.3.1 Avaliação da lipoperoxidação (LP) pelo método de quimiluminescência (QL) das hemácias de rato.

Sistemicamente a QL induzida por tert-butil-hidroperóxido (t-butil) das hemácias de ratos apresentou um perfil diferente da QL de cérebro. Na figura 14 pode-se analisar que o grupo que apresentou maior lipoperoxidação das estruturas celulares foram os que sofreram a RS por 72h ($p < 0,0001$). Em contrapartida, 5 minutos no LCE também foram suficientes para que ocorresse o ataque de espécies reativas de oxigênio.

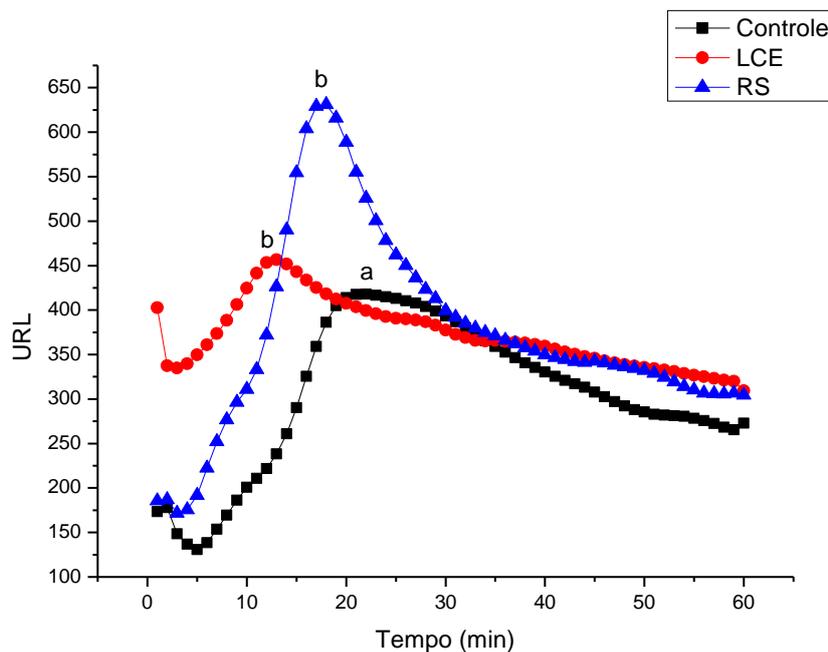


Figura 14 – Análise da lipoperoxidação pelo método de quimiluminescência (QL) induzida por tert-butil-hidroperóxido das hemácias de rato. Sistemicamente a RS por 72h causou maior estresse oxidativo. Mas é possível verificar que o LCE por si só também gera o estresse nas hemácias de ratos ($p < 0,0001$). Teste estatístico two-way ANOVA, onde letras iguais representam resultado não significativo e letras diferentes indicam que o resultado foi significativo.

4.3.2 Avaliação da lipoperoxidação (LP) pelo método de quimiluminescência (QL) do plasma de rato.

A QL de plasma induzida por tert-butil-hidroperóxido mostra novamente que o teste do LCE sozinho gerou maior estresse oxidativo em relação aos outros grupos ($p < 0,0001$), bem como a RS também ocasionou maior lipoperoxidação no plasma.

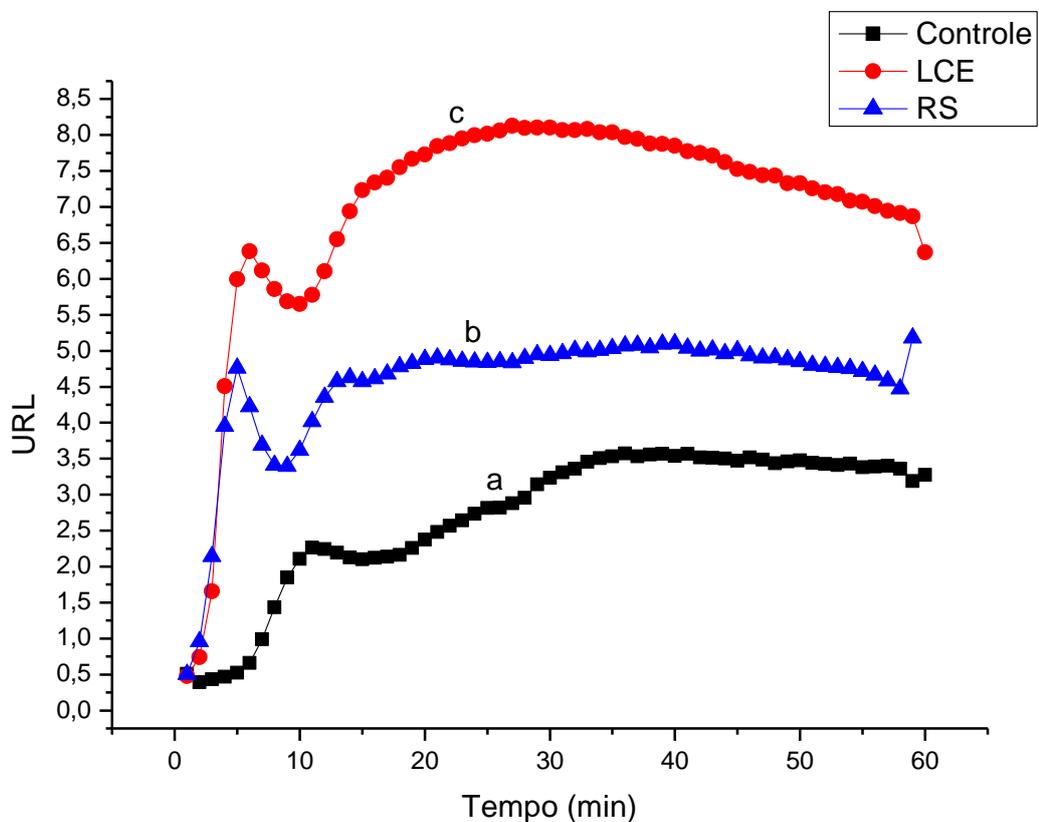


Figura 15 - Avaliação da lipoperoxidação pelo método de quimiluminescência (QL) induzida por tert-butil-hidroperóxido do plasma de rato. Tanto o LCE por 5 minutos, quanto a RS por 72h geraram estresse oxidativo no plasma dos ratos ($p < 0,0001$). O teste utilizado foi o two-way ANOVA, onde letras iguais representam resultado não significativo e letras diferentes indicam que o resultado foi significativo.

4.3.3 Análise da capacidade antioxidante total (TRAP) por quimiluminescência (QL) do plasma de ratos.

Sistemicamente a capacidade antioxidante total não foi alterada pelo LCE por 5 minutos, nem pela RS por 72 horas como mostra a figura 16.

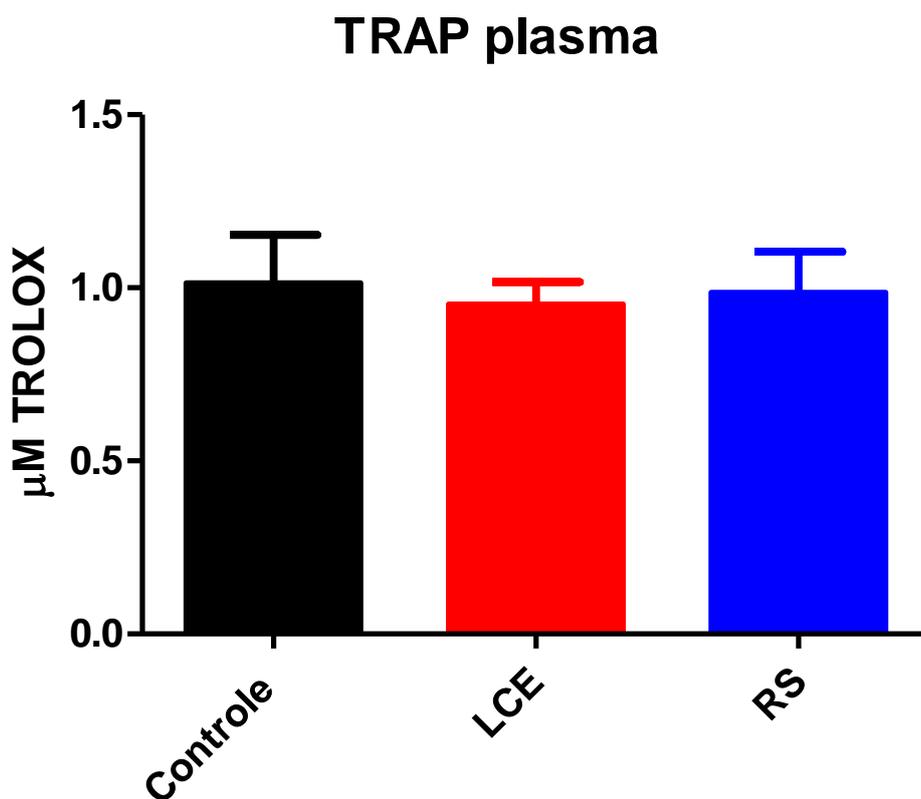


Figura 16 – A análise da capacidade antioxidante total por quimiluminescência mostra que a RS e o LCE não foram suficientes para alterar o consumo de antioxidantes no plasma de ratos. O teste utilizado foi o one-way ANOVA.

4.3.4 Avaliação dos níveis de glutaciona (GSH) nas hemácias de ratos.

A análise da concentração de GSH mostra que o teste do LCE por 5 minutos elevou seu nível no sangue dos animais ($p < 0,008$). No entanto a RS por 72 horas não foi capaz de alterar a concentração deste antioxidante nas hemácias dos ratos.

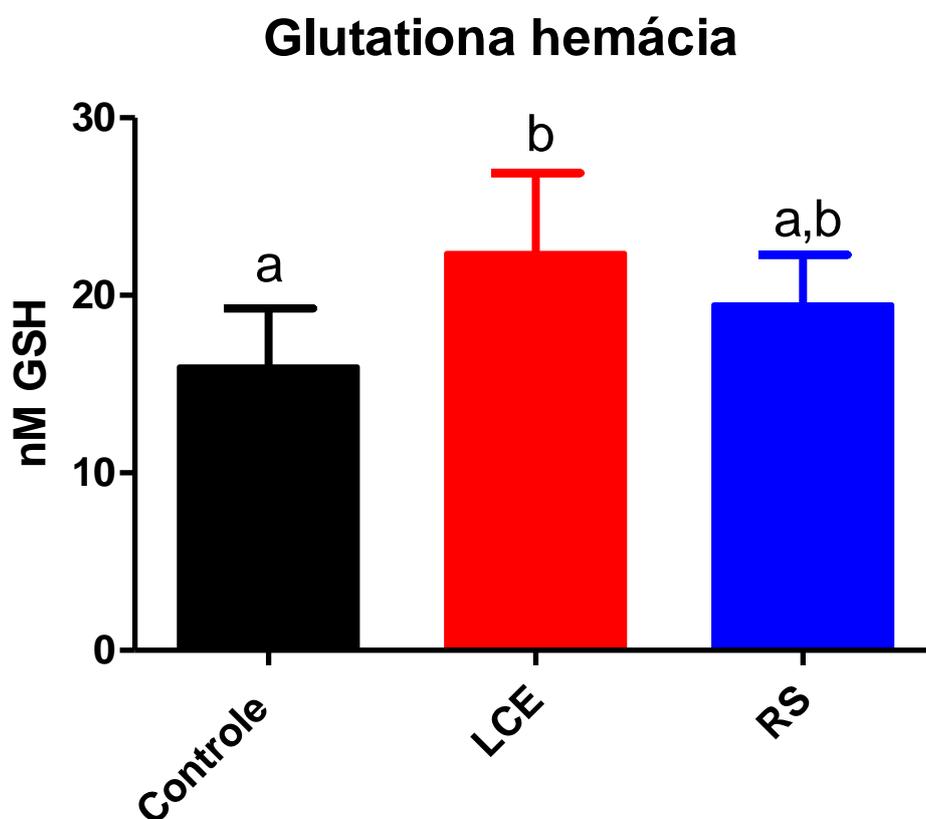


Figura 17 – Determinação da concentração de GSH nas hemácias de ratos. Os níveis de glutaciona são elevados após o teste do LCE por 5 minutos ($p < 0,008$). O teste utilizado foi o one-way ANOVA, onde letras iguais representam resultado não significativo e letras diferentes indicam que o resultado foi significativo.

4.3.5 Determinação da concentração de nitrito plasmático pelo método cádmio-cobre em ratos.

A análise da produção de NO plasmático pelo método cádmio-cobre revela que dentre os três grupos o grupo que passou pelo teste do LCE por 5 minutos apresentou maior síntese de NO ($p < 0,003$). Outro ponto a ser observado é de que a RS por 72h não alterou as concentrações do NO no plasma dos ratos.

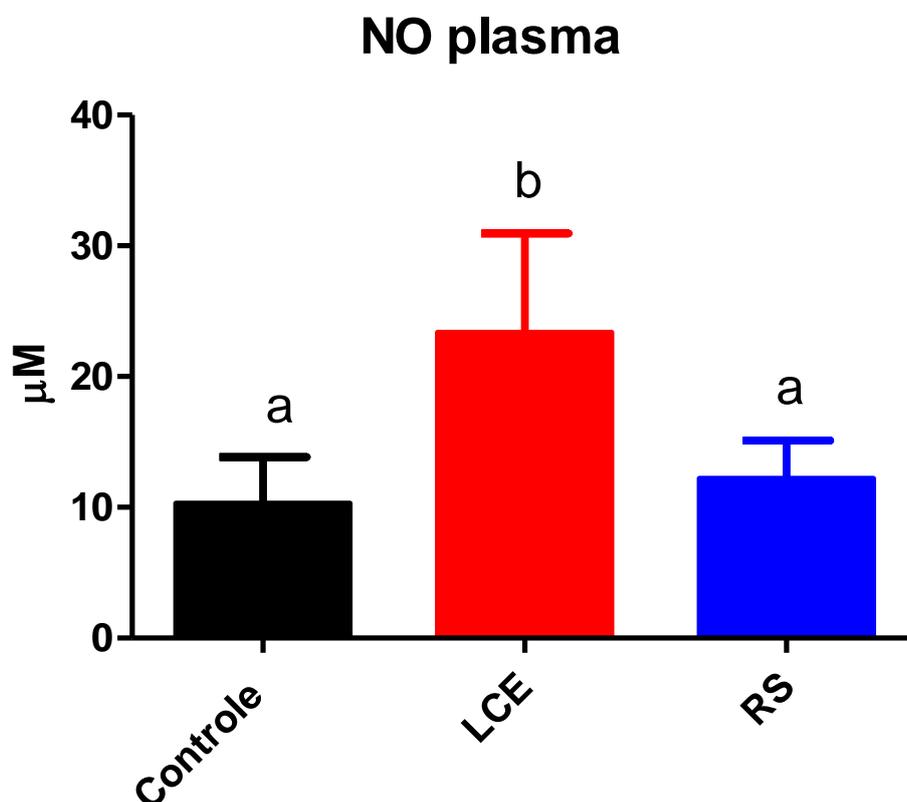


Figura 18 – A análise da concentração de nitrito pelo método cádmio-cobre mostra que a RS por 72h não alterou a produção de óxido nítrico no plasma dos ratos. Entretanto os ratos submetidos ao LCE por 5 minutos apresentaram uma elevação na concentração de NO plasmático ($p < 0,003$). O teste utilizado foi o one-way ANOVA, onde letras iguais representam resultado não significativo e letras diferentes indicam que o resultado foi significativo.

4.4 Análise do índice de massa corporal (IMC)

Os animais foram pesados antes de serem submetidos ao LCE e antes de permanecerem na plataforma por 72 horas durante a RS. Após esse período eles foram pesados novamente antes de serem sacrificados. Este procedimento foi realizado para verificar a variação de peso durante os experimentos já que a RS altera o metabolismo energético do animal.

A fórmula utilizada foi:

$$\text{IMC\%} = \frac{\text{Massa inicial RS} - \text{Massa final RS} + \text{Ganho Massa CTL}}{\text{Massa inicial RS} + \text{Ganho Massa CTL}}$$

De acordo com esta fórmula os ratos RS por 72 horas apresentaram uma redução de 19% no seu IMC. Já os ratos que passaram pelo labirinto em cruz elevado não sofreram nenhuma alteração na sua massa corporal.

5 DISCUSSÃO

Diversos autores consideram a RS um fator de risco que leva ao aparecimento de varias doenças (KUMAR & SINGH, 2007). No entanto há poucos estudos que tratam desse assunto e as consequências físicas, bioquímicas e psicológicas relacionadas com a RS são pouco conhecidas. Sabe-se que ela promove alterações comportamentais, hormonais, neuroquímicas e bioquímicas. E também influencia a termorregulação, o sistema imune e a alimentação (MOREIRA, 2006; CIRELLI, 2006; MCEWEN, 2006; STEIGER, 2007). Um efeito observado na RS é a perda de peso corporal apesar do aumento da ingestão calórica (EVERSON & WEHR, 1993). Este dado pode ser comprovado, pois a análise da perda de massa corporal realizada neste estudo mostrou que os ratos RS apresentaram uma redução de 19% de sua massa corporal em relação ao grupo controle, corroborando com o estudo realizado por Everson e colaboradores (2004), onde os animais RS perderam 16% do seu peso corporal. Trabalhos anteriores mostram que o aumento do consumo de comida durante o período de RS pode ser adaptativa (EVERSON & WEHR, 1993). Isto sugere que haja um estresse descompensado o que levaria a uma limitação nutricional. Ou seja, há um desgaste nutricional provocado pela RS aguda devido ao aumento do metabolismo e apesar de se alimentarem durante o processo isso não é suficiente para que o rato ganhe massa corporal.

5.1 Discussões referentes às análises do teste do LCE.

O labirinto em cruz elevado é um teste comportamental amplamente utilizado por pesquisadores que visam verificar o comportamento de ansiedade em diversos modelos experimentais. Ele foi primeiramente descrito por Handley & Mithani (1984) que adaptaram o método proposto por Montgomery em 1958. A premissa básica descrita por este autor é de que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva. Montgomery constatou ainda que os ratos preferem consistentemente os braços fechados do labirinto em Y. Em seu estudo, Montgomery interpretou a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia (“medo da novidade”) e pela elevação do braço aberto. A proposta de se desenvolver um novo teste para avaliar a ansiedade foi indicada, pois os métodos existentes para verificar esse comportamento podiam alterar a resposta do animal as drogas por serem estímulos nocivos, como o choque elétrico, ou privação de água e comida (PELLOW et al., 1984).

O LCE é um método simples e rápido (5 minutos apenas), mas eficiente para avaliar o comportamento relacionado com a ansiedade do animal. Ele é largamente utilizado em diversos estudos para verificar o efeito de drogas ansiolíticas e o efeito de agentes ansiogênicos. Sua funcionalidade como modelo experimental de ansiedade baseia-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural do animal aos braços abertos (VIDAL). A análise do número de entradas e tempo gasto nos braços abertos são indicadores da instalação da ansiedade. O animal classificado como ansioso evita entrar ou permanecer nos braços abertos. Portanto, o número de

entradas e/ou tempo despendido nestes braços são inversamente proporcionais ao comportamento de ansiedade. A partir dos resultados obtidos na figura 7, pode-se dizer que a RS não gerou ansiedade nos ratos já que o tempo gasto nos braços abertos não foi alterado por esta condição. O mesmo vale para os resultados encontrados na figura 8 A, onde a frequência de entradas nas extremidades dos braços abertos também não sofreu modificações após a RS por 72h.

Com base nos resultados é possível analisar que a RS por 72h diminuiu a mobilidade do animal dentro do LCE (Figura 9). Estudos anteriores concordam com esses achados, pois a redução da atividade motora do animal dentro do LCE é uma consequência da RS (RIAL et al., 2007; KNUTSON et al., 2007).

Alguns autores propuseram que a sensibilidade e confiabilidade de um teste melhorariam se a atenção do pesquisador fosse voltada não só para o número de entradas ou tempo gasto nos braços abertos, mas também que fosse analisado o que os animais fazem de fato dentro do labirinto (RODGERS, 1995). Por esse motivo, neste estudo nós investigamos parâmetros como atividade locomotora, ato de levantar (comportamento exploratório em que o animal estende acima seu corpo e patas dianteiras, apoiado sobre as traseiras), esticar (postura em que o animal se estende cautelosamente adiante, sem, no entanto, retirar do lugar suas patas traseiras, voltando em seguida, à mesma posição), autolimpeza e abaixar a cabeça (movimentos exploratórios de cabeça e ombro abaixo do chão dos braços abertos).

As análises referentes à Tabela 1 mostram novas medidas que foram incorporadas na avaliação comportamental, medidas etológicas (RODGERS et al., 1995, RODGERS et al., 1997). Essas medidas refletem o comportamento exploratório do animal. Rodgers et al (1997) mostrou em seus experimentos com camundongos, que os movimentos de abaixar a cabeça (head-dipping), esticar o corpo e retorno aos braços fechados parecem preencher os requisitos de uma avaliação de risco (risk assessment). Neste estudo estes comportamentos foram reduzidos nos animais que sofreram RS por 72h, apenas o comportamento de autolimpeza foi maior nos ratos RS, pois estes estavam úmidos devido a sua permanência na plataforma submersa minutos antes de iniciarem os testes do LCE.

Os parâmetros comportamentais analisados no LCE estão dentro da normalidade, ou seja, sem a indicação de ansiedade ou qualquer alteração comportamental significativa. Mas o teste em si pode provocar estresse oxidativo nos sistemas estudados cujos resultados serão discutidos a seguir.

5.2 Discussões referentes aos resultados de estresse oxidativo obtidos das amostras de cérebro.

A RS é considerada um estressor que leva ao desenvolvimento de diversas doenças neurológicas e muitos desses efeitos deletérios da RS são mediados por alterações neuroquímicas e hormonais que estão associadas com o EO (KNUTSON et al., 2007).

Estudos anteriores mostram que a RS gera estresse oxidativo e enfraquece o sistema de defesa antioxidante (GOPALAKRISHNAN et al., 2004; RAMANANTHAN et al., 2002; KUMAR e KALONIA, 2007; KALONIA e KUMAR, 2007). No entanto, no presente estudo, 72h de RS não foram suficientes para causar estresse oxidativo no cérebro dos ratos (Figura 10). O cérebro é o centro de controle de quase todas as atividades vitais necessárias à sobrevivência. Devido a isso ele possui inúmeras estratégias de defesas contra possíveis danos a seus milhares de neurônios. Estudos prévios que corroboram com estes resultados, realizados por D'Almeida e colaboradores (1997) com homogenato de cérebro inteiro mostraram que a RS não causou lipoperoxidação e não alterou a atividade da SOD no cérebro. Gopalakrishnan e colaboradores (2004) também verificaram a ausência do estresse oxidativo no cérebro de ratos no período de 72h a 14 dias de restrição de sono. Já Singh e colaboradores (2008) encontraram uma redução da lipoperoxidação no cortex cerebral e tronco cerebral em ratos RS. No entanto, eles verificaram um aumento da lipoperoxidação no hipocampo, tálamo e hipotálamo. Isso mostra que a RS gera estresse oxidativo em diferentes proporções dependendo da região cerebral. Essas diferenças na geração do EO nas regiões do cérebro podem ser explicadas pela ação dos antioxidantes.

O LCE, por outro lado foi um agente estressor muito mais eficaz que a RS. Pode-se constatar um aumento da lipoperoxidação no cérebro dos animais submetidos ao LCE (Figura 10). Sendo assim, o LCE é um potente estressor que leva ao estresse neuronal por ser capaz de provocar a lipoperoxidação das estruturas celulares do cérebro. Apesar do LCE ser um teste comportamental

amplamente utilizado para avaliar o efeito de drogas ansiolíticas e o comportamento de ansiedade nos animais, não foram encontrados estudos que avaliam a influência do LCE na geração do estresse oxidativo. Os resultados encontrados neste estudos são relevantes já que eles demonstram que este teste comportamental pode causar alterações oxidativas importantes no SNC.

A capacidade antioxidante total (TRAP) do cérebro também foi avaliada sendo que não foi encontrada alteração em relação aos animais controle (Figura 11). Com isso observa-se um equilíbrio e a manutenção da homeostasia cerebral durante o período de restrição do sono e após a aplicação do teste LCE. Isto indica que o cérebro é preservado do ataque das ERO após a aplicação dos agentes estressores. O mesmo ocorreu na determinação dos níveis de GSH neste tecido (Figura 12). A glutathiona reduzida é um potente *scavenger* de radicais livres e também serve como substrato para a glutathiona peroxidase (GPx). Ela é considerada o tiol não protéico mais abundante nos mamíferos, com sua concentração no SNC variando de 1-3 mM. A GSH desempenha funções antioxidantes importantes no sequestro de radicais livres, agindo como doadora de elétrons para redução de peróxidos orgânicos e de hidrogênio. No SNC, os astrócitos têm uma maior concentração de GSH quando comparado aos neurônios e exercem papel importante no controle da liberação de GSH para os neurônios (COOPER, 1997; DRINGEN & HIRRLINGER, 2003).

Segundo Singh e colaboradores (2008), que realizaram a análise do EO em regiões distintas do cérebro, houve um aumento da atividade da SOD e nenhuma redução da atividade da GSH no cortex e tronco cerebral em

modelos de RS. Diferentemente do hipocampo, tálamo e hipotálamo, que apresentaram diminuição da atividade desses dois antioxidantes. A estabilidade dos níveis de antioxidantes no cérebro durante a RS por 72h pode explicar em partes a ausência da geração do estresse oxidativo durante este período, pois no caso da aplicação do teste de LCE apesar de haver a lipoperoxidação, os níveis de antioxidantes totais e da glutathione permaneceram normais, indicando um possível desequilíbrio podendo desencadear o estresse oxidativo.

Desde sua descoberta em 1980, o NO tem sido amplamente investigado não só como um radical livre, mas também como um importante mensageiro parácrino (McDONALD & MURAD, 1995). Ele está presente no SNC e periférico e regula uma grande variedade de funções fisiológicas incluindo os processos de memória, plasticidade sináptica e o fluxo sanguíneo. Aprendizagem e memória são termos que estão intimamente relacionados e o NO participa deste processo. Yamada e colaboradores (1995) demonstraram que a administração sistêmica de L-NAME (inibidor de cNOS) prejudicou o desempenho de ratos durante a aquisição de memória espacial no teste do labirinto radial. Esses mesmos autores em 1996, verificaram que o prejuízo da memória de ratos idosos foi acompanhado por uma diminuição na produção de NO no cérebro. Calixto e colaboradores (2001) concluíram que NO pode estar relacionado com o medo aprendido, pela verificação do prejuízo na resposta de esQUIVA inibitória, com a administração de L-NAME.

Diversos estudos demonstram que o óxido nítrico também participa da regulação do ciclo sono-vigília bem como da regulação do processo circadiano

do sono (KAPAS et al. 1994; DZOLJIC et al. 1997; BURLET et al. 1999; GAUTIER-SAUVIGNE et al., 2005). De acordo com nossos resultados, a produção de NO no cérebro não foi alterada pela RS por 72h (Figura 13). No entanto, as concentrações de NO reduziram significativamente no cérebro dos ratos que foram submetidos ao LCE em relação ao grupo RS (Figura 13). Provavelmente o LCE provocou estímulos de aprendizagem/memória os quais consumiram o NO cerebral (CALIXTO et al., 2001).

5.3 Discussões referentes aos resultados obtidos das amostras de sangue.

A oxidação sistêmica tem sido amplamente estudada como modelo para avaliar o dano oxidativo sobre biomembranas. Entretanto em se tratando de restrição do sono, não existem estudos sobre o reflexo da RS no plasma como forma de avaliação sistêmica do dano celular. Os trabalhos encontrados na literatura estimam o EO sistêmico através da análise de órgãos como fígado e músculo esquelético (GOPALAKRISHNAN et al., 2004).

Quando há ataque dos radicais livres sobre as membranas dos eritrócitos ocorre oxidação dos lipídios e proteínas causando hemólise (SIES, 1993). As membranas das células e organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados e o ataque de algumas espécies reativas a essa estrutura inicia o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL & GUITTERIDGE, 1991). A lipoperoxidação como consequência do ataque das ERO às membranas celulares, provoca perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos

lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

No presente estudo, a análise da lipoperoxidação das hemácias pelo método de quimiluminescência induzida por tert-butil-hidroperóxido, um método sensível para verificar a presença do EO (BOVERIS et al., 1983), mostrou que, sistemicamente, a RS por 72h provocou estresse oxidativo nas membranas das hemácias (Figura 14). Outro ponto importante desta análise é que o LCE também ocasionou a geração de EO nas hemácias, mostrando novamente que o LCE, por si só, é capaz de provocar danos nas membranas celulares através da geração de radicais livres (Figura 14). Segundo Ongajooth e colaboradores (1996) o EO causa um aumento da rigidez e deformidade das membranas das hemácias, que por sua vez aumenta a suscetibilidade destas à hemólise.

Assim como na QL de hemácias a RS também refletiu o dano oxidativo no plasma (Figura 15). Estudos anteriores apenas verificaram o estresse oxidativo sistêmico através da análise de alguns parâmetros de lesão celular, como a ALT e a AST, que representam dano celular hepático. No entanto, o plasma reflete o estresse oxidativo sistêmico de forma geral, estendendo a análise para o organismo como um todo, incluindo fígado e músculo esquelético. Os resultados obtidos com a quimiluminescência de plasma do mesmo modo apontam o LCE também como agente estressor das estruturas plasmáticas.

As análises dos antioxidantes mostram que no TRAP de plasma a RS não alterou o consumo destas moléculas (Figura 16). Outra análise feita nas

hemácias dos ratos mostra que os níveis de GSH novamente não foram alterados pela RS por 72h, embora, novamente, a submissão ao LCE levou ao aumento significativo de GSH (Figura 17).

A determinação da concentração de nitrito plasmático pelo método cádmio-cobre em ratos demonstra que o grupo submetido ao LCE aumentou expressivamente a síntese de NO. Neste caso o LCE favoreceu sua produção aumentando os níveis plasmáticos de NO. Este fato pode explicar, em partes, o aumento da lipoperoxidação no plasma do grupo submetido ao LCE (Figura 18), já que o NO é um radical livre presente na circulação.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os dados apresentados neste trabalho pode-se concluir que:

- ✚ As análises do teste do LCE revelam que 72h de RS não gerou ansiedade nos ratos, mas prejudicou a atividade motora bem como os comportamentos exploratórios dos animais.
- ✚ Por ser um método vastamente utilizado para analisar a ansiedade em modelos experimentais de estresse oxidativo, é preciso ter cautela ao escolhê-lo, pois surpreendentemente, 5 minutos do teste do LCE gerou EO em todas as análises de QL feitas neste estudo, tanto no cérebro, quanto no sangue. Desta forma ele pode influenciar a geração do EO nos animais.
- ✚ De acordo com nossos resultados não há lipoperoxidação no cérebro de ratos RS por 72 hs, mas há detecção de EO sistêmico. Tanto plasma quanto hemácias apresentam aumento de lipoperoxidação quando comparados ao controle.
- ✚ A análise da capacidade antioxidante total tanto do cérebro quanto do plasma revela que não há mudança neste perfil para os animais RS ou para os submetidos ao LCE.
- ✚ A análise da capacidade antioxidante enzimática revela que no cérebro este parâmetro também não se modifica para ambos agentes estressores. Por outro lado, há um aumento de glutathiona reduzida nas hemácias dos animais submetidos ao LCE.

- ✚ Houve uma diminuição de NO no cérebro e um aumento no plasma de NO nos animais submetidos ao LCE.

Concluindo, tanto a restrição do sono aguda quanto a aplicação do teste do Labirinto em Cruz Elevado podem ser considerados agentes estressores e levar a alterações oxidativas cerebrais e sistêmicas. E mais, dependendo do tecido analisado, há uma diferença de resposta e que a resposta sistêmica parece ser mais sensível que a do cérebro quando da aplicação destes agentes estressores. Surpreendentemente, um teste aparentemente inofensivo como o LCE, também pode desencadear um estresse oxidativo cerebral e sistêmico mais exacerbado que a própria restrição do sono por 72 horas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSEN, M.L., MARTINS, P.J., ALMEIDA, V.D., BIGNOTTO, M., TUFIK, S., et al. The effect of acute cocaine administration in paradoxical sleep deprived rats. **Addiction Biol.**, 5:417-20, 2000.
2. ANDERSEN, M.L., MARTINS, P.J., ALMEIDA, V.D., BIGNOTTO, M., TUFIK, S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. **J Sleep Res.**, 14:83-90, 2005.
3. AYAS, N.T., WHITE, D.P., MANSON, J.E. A prospective study of sleep duration and coronary heart disease in women. **Arch Intern Med.**, 163:205-209, 2003.
4. AYAS, N.T., WHITE, D.P., MANSON, J.E., et al. A prospective study of sleep duration and type II diabetes in women. **Diabetes Care**, 26:380-384, 2003.
5. BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, 271: C1424-37, 1996.
6. BERGMANN BM, EVERSON CA, KUSHIDA CA, FANG VS, LEITCH CA, SCHOELLER DA, REFETOFF S, RECHTSCHAFFEN A. Sleep deprivation in the rat: V. Energy use and mediation. **Sleep**. Feb; 12(1):31-41, 1989.
7. BORN J.; FEHM HL. The neuroendocrine recovery function of sleep. **Noise Health**,2(7):25-38, 2000.
8. BOVERIS A, FRAGA CG, VARSAVSKY AI, KOCH OR. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys**. Dec;227(2):534-41, 1983.
9. BUENO, O.F., LOBO, L.L., OLIVEIRA,M.G., GUGLIANO, E.B., POMARICO, A.C., TUFIK, S. Dissociated paradoxical sleep deprivation effects on inhibitory avoidance and conditioned fear. **Physiology & Behavior** 56, 775–779, 1994.
10. BURLET, S., LE ´GER, L., CESPUGLIO, R. Nitric oxide and sleep in the rat: a puzzling relationship. **Neuroscience** 92, 627–639, 1999.

11. CAHUANA, G.M., TEJEDO, J.R., RAMIREZ, R., SOBRINO, F., BEDOYA, F.J. Nitric oxide-induced carbonylation of Bcl-2, GAPDH and ANT precedes apoptotic events in insulin-secreting RINm5F cells. **Exp. Cell Res.** 293, 22-30, 2004.
12. CALIXTO AV, VANDRESEN N, DE NUCCI G, MORENO H, FARIA MS. Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. **Brain Res Bull.** May 1;55(1):37-42, 2001.
13. CIRELLI, C. Cellular consequences of sleep deprivation in the brain. **Sleep Medicine Reviews**, 10, 307–32, 2006.
14. CLAUSTRAT B, BRUN J, CHAZOT G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med Rev.**, 9, pp. 11-24, 2005.
15. COOPER, A.J.L. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: *The Molecular and Genetics Basis of Neurological Disease* (Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L. & Kunk, L.M., eds.) 1195-1230, Butterworth-Heinemann, Boston, 1997.
16. CRONFLI R.T. A Importância do Sono. **Revista Cérebro & Mente**, 2002.
17. D'ALMEIDA V, HIPÓLIDE DC, AZZALIS LA, LOBO LL, JUNQUEIRA VB, TUFIK S. Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. **Neurosci Lett.** Oct 10;235(1-2):25-8, 1997.
18. D'ALMEIDA. V., LOBO, L.L., HIPPOLIDE, D.C., DE OLIVEIRA, A.C., NOBREGA, J.N., TUfIK, S. Sleep deprivation induces brain region-specific decrease in glutathione levels. **Neuroreport** 9:2853–2856, 1998.
19. DAWSON D, ARMSTRONG SM. Chronobiotics-drugs that shift rhythms. **Pharmacol Ther.**, 69(1), pp. 15-36, 1996.
20. DIJK DJ, CAJOCHEN C. Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. **J Biol Rhythms.**, 12, pp. 627-635, 1997.
21. DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biol.Chem.** v.384, p.505–516, 2005.
22. DZOLJIC, E., VAN LEEUWEN, R., DE VRIES, R., DZOLJIC, M.R.. Vigilance and EEG power in rats: effects of potent inhibitors of the neuronal nitric oxide synthase. **Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.** 356, 56–61, 1997.

23. EISERICH, J. P.; CROSS, C. E.; JONES, A. D.; HALLIWELL, B.; VLIET, A. V.; **J. Biol. Chem.**, 271, 19199, 1996.
24. EVERSON CA, BERGMANN BM, RECHTSCHAFFEN A. Sleep deprivation in the rat. III. Total sleep deprivation. **Sleep**, 12:13-21, 1989.
25. EVERSON, C.A., WEHR, T.A. Nutritional and metabolic adaptations to prolonged sleep deprivation in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 264: R376–R387, 1993.
26. EVERSON, C.A., LAATSCH, C.D., HOGG, N. Antioxidant defense responses to sleep loss and sleep recovery. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 288: R374–R383, 2005.
27. FERREIRA AL, MATSUBARA LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Rev Assoc Med Bras.** 43(1):61-8. 1997.
28. FLECHA, B.G., LLESUY, S. AND BOVERIS, A. **Free Rad. Biol. Med.**, 10, 93–100, 1991.
29. FURCHGOTT, R.T. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-6, 1980.
30. GAUTIER-SAUVIGNE, S., COLAS, D., PARMANTIER, P., CLEMENT, P., GHARIB, A., SARDA, N., CESPUGLIO, R. Nitric oxide and sleep. **Sleep Med. Rev.** 9, 101–113, 2005.
31. GOPALAKRISHNAN, A., JI, L.L., CIRELLI, C. Sleep deprivation and cellular responses to oxidative stress. **Sleep** 27, 27–35, 2004.
32. GOTTLIEB DJ, PUNJABI NM, NEWMAN AB, et al: Association of sleep time with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. **Arch Intern Med** 165:863-868, 2005.
33. GOTTLIEB DJ, REDLINE S, NIETO FJ, et al: Association of usual sleep duration with hypertension: The sleep heart health study. **Sleep** 29:1009-1014, 2006.
34. GOW, A.J., FARKOUH, C.R., MUNSON, D.A., POSENCHEG, M.A., ISCHIROPOULOS, H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.** 287, L262-L268, 2004.

35. GRIESS, J. P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "ueber einige azoverbindugen". **Chem. Ber.**, 12: 426-428, 1879.
36. GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Rad. Res. Comm.**, 19, 141, 1993.
37. GUZMAN-MARIN, R., BASHIR, T., SUNTSOVA, N., SZYMUSIAK, R., MCGINTY, D. Hippocampal neurogenesis is reduced by sleep fragmentation in the adult rat. **Neuroscience** 148 325–333, 2007.
38. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys.**, 246: 501-14, 1986.
39. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, 186: 1-85, 1990.
40. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M .C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Claredon Press, Oxford, p 543, 1991.
41. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., CROSS, C.E. **J. Lab. Clin. Med.**, 119, 598, 1992.
42. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M .C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, 1999. 3^a edition.
43. HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, 59: 1.609-23, 1992.
44. HALLIWELL, B.; **Mutat. Res.**, 443, 37, 1999.
45. HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H.; FEBS Lett. 2000, 486, 10; Babior, B. M.; **Am. J. Med.**, 109, 33, 2000.
46. HANDLEY, S.L., MITHANI, S. Effects of α -adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear-motivated" behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 327 1-5, 1984.
47. HARRIS, P.F., OVERSTREET, D.H., ORBACH, J. Disruption of passive avoidance memory by REM sleep deprivation, methodological and pharmacological considerations. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior** 17, 1119–1122, 1982.

48. HARRISON, Y., HORNE, J.A. Sleep loss and temporal memory. **Quarterly Journal of Experimental Psychology** A53, 271–279, 2000.
49. HAUS E.; SMOLENSKY MH. Biologic rhythms in the immune system. **Chronobiol Int.** 16(5):581-622, 1999.
50. HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 54 (1), 21-30, 1996.
51. HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P.; **Phytochemistry**, 26, 2489, 1987.
52. IKEDA, M., IKEDA-SAGARA, M., OKADA, T., CLEMENT, P., URADE, Y., NAGAI, T., SUGIYAMA, T., YOSHIOKA, T., HONDA, K., INOUE, S. Brain oxidation is an initial process in sleep induction. **Neuroscience** 130:1029–1040, 2005.
53. INSTITUTO DO SONO. Disponível em: <http://www.sono.org.br/sono.html>, acesso em 30 de setembro de 2009.
54. JANET M. MULLINGTON, MONIKA HAACK, MARIA TOTH, JORGE M. SERRADOR AND HANS K. MEIER-EWERT. Cardiovascular, Inflammatory, and Metabolic Consequences of Sleep Deprivation. **Progress in Cardiovascular Diseases**, Vol. 51, No. 4 (January/February), pp 294-302, 2009.
55. KALONIA, H., KUMAR, A. Protective effect of melatonin on certain behavioral and biochemical alterations induced by sleep-deprivation in mice. **Indian J. Pharmacol.** 39, 48-51, 2007
56. KAPAS L., SHIBATA M., KIMURA M. AND KRUEGER J. M. Inhibition of nitric oxide synthesis suppresses sleep in rabbits. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.** 226, R151–R157, 1994.
57. KEHRER, J. P.; **Toxicology**, 149, 43, 2000.
58. KNUTSON, L.K., SPIEGEL, K., PENEV, P., CAUTER, E.V. The metabolic consequences of sleep deprivation. **Sleep Med. Rev.** 11 (3), 163-178, 2007.
59. KUMAR, A., KALONIA, H. Protective effect of *Withania somnifera* Dunal on the behavioral and biochemical alterations in sleep-deprivation mice

- (grid over water suspended method). **Indian J. Exp. Biol.** 45 (6), 524-528, 2007.
- 60.KUMAR, A., SINGH, A. Protective effect of St. john's wort (*Hypericum perforatum*) extract on 72-hour sleep deprived induced anxiety like behavior and oxidative damage in mice. **Planta Med.** 73, 1358–1364, 2007.
- 61.LACK LC, WRIGHT HR. Chronobiology of sleep in humans. **Cell Mol Life Sci.**, 64, pp. 1205-1215, 2007.
- 62.LARSON, R. A.; Naturally Occurring Antioxidants, Lewis Publishers: New York, p. 7, 1997.
- 63.MALIK, S.W., KAPLAN, J. Sleep Deprivation. **Prim Care Clin Office Pract** 32 475–490, 2005.
- 64.MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J.Biol.Chem.**, 268(17): 12231-4, 1993.
- 65.MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, 78: 927-30, 1994.
- 66.MCDONALD LJ, MURAD F. Nitric oxide and cyclic cGMP signaling. **Adv Pharmacol**, 34:263–75, 1995.
- 67.MCEWEN, B.S. Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: allostasis and allostatic load. **Metabolism** 55,S20-S23, 2006.
- 68.MEDNICK, S.C., NAKAYAMA, K., CANTERO, J.L., ATIENZA, M., LEVIN,A.A., PATHAK, N., STICKGOLD, R. The restorative effect of naps on perceptual deterioration. **Nature Neuroscience** 5, 677–681, 2002.
- 69.MEISTER A, ANDERSON ME. Glutathione. **Annu Rev Biochem.**, 52: 711-60, 1983.
- 70.MIZOGUCHI K., YUZURIHARA M., ISHIGE A., SASAKI H., TABIRA T. Chronic stress impairs rotarod performance in rats: implications for depressive state. **Pharmacol Biochem Behav.**, 71:79-84, 2002.
- 71.MONCADA, S. et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**, 43(2): 109-42, 1991
- 72.MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 48: 254-260, 1958.

73. MULLINGTON JM, CHAN JL, SAMARAS J, et al: Sleep loss reduces the amplitude of the diurnal leptin rhythm in healthy men. **J Neuroendocrinol.**, 15:851-854, 2003.
74. NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clin. Chem.**, 44 (3):670-681, 1998.
75. NEMEROFF CB. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry.**, 1(4):336, 1996.
76. OBERMEYER, W., BERGMANN, B.M., RECHTSCHAFFEN, A. Sleep deprivation in the rat. XIV. Comparison of waking hypothalamic and peritoneal temperatures. **Sleep**, 14, 285-293, 1991.
77. ONGAJOOTH L, ONGAJYOOOTH S, LIKIDLILID A, CHANTACHUM Y, SHAYAKUL C, NILWARANGKUR S. Role of lipid peroxidation, trace elements and anti-oxidant enzymes in chronic renal disease patients. **J Med Assoc Thai.** Dec; 79(12):791-800, 1996.
78. PALMA, B.D., TIBA, P.A., MACHADO, R.B., TUFIK, S., SUCHECKI, D. Repercussões imunológicas dos distúrbios do sono: o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal como fator modulador. **Rev Bras Psiquiatr.**, 29(Supl I):S33-8, 2007.
79. PALMBLAD J., AKERSTEDT T., FROBERG J., et al. Thyroid and adrenomedullary reactions during sleep deprivation. **Acta Endocrinol** 90:233-239, 1979.
80. PANIS, C. Papel antagônico das isoformas óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e induzida (iNOS) em camundongos nocautes para 5-lipoxigenase infectados com *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, 98 páginas, 2009.
81. PAPPOLLA, M.A., POEGGELER, B., REITER, R.J. La hipótesis oxidativa en La enfermedad de Alzheimer. Papel de la melatonina como antioxidante y como agente antibeta amiloide. **Antioxidantes y Calidad de Vida**, v.8, p.8-19, 2001.

82. PARDRIDGE, W.M., MIETUS, L.J. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. **J Neurochem.**, 34, pp. 1761-1763, 1980.
83. PAREDES, R.G., AGMO, A. GABA and behavior: the role of receptor subtypes. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 16, 145-170, 1992.
84. PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Meth.**, 14, 149-167, 1985.
85. PIERI, C., MARRA, M., MORONI, F., RECCHIONI, R., MARCHISELLI, F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Science**, v.55, p.271-276, 1994.
86. RABOW, L.E., RUSSEK, S.J., FARB, D.H. From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. **Synapse** 21, 189-274, 1995.
87. RADOMSKI, M.W., HART, L.E., GOODMAN, J.M., et al. Aerobic fitness and hormonal responses to prolonged sleep deprivation and sustained mental work. **Aviat Space Environ Med** 63:101-106, 1992.
88. RAJARATNAM SM, ARENDT J. Health in a 24-h society. **Lancet.** Sep 22;358(9286):999-1005, 2001.
89. RAMANANTHAN, L., GULAYANI, S., NIENHUIS, R., SIEGEL, J.M. Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. **Neuroreport** 11, 1387-1390, 2002.
90. REES, D.D. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, 101: 746-52, 1990.
91. REIMUND, E. The free radical theory of sleep. **Med.Hypotheses**, 43 231-233, 1994.
92. REITER, R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr Rev.**, 12, pp. 151-180, 1991.
93. REITER, R.J., TAN, D.X., BURKHARDT, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.123, p.1007-1019, 2002.

94. REPETTO, M.G., REIDES, C.G., CARRETERO, M.L., COSTA, M., GRIMBERG, G., LLESUY, S.F. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin. Chem. Acta** 255, 107–117, 1996.
95. RIAL, V.R., NICOLAU, C.M., GAMUNDÍ, A., AKAÂRIR, M., APARICIO, S., GARAU, C., TEJADA, S., ROCA, C., GENE, L., MORANTO, D., ESTEBAN, S. The trivial function of sleep. **Sleep Med. Rev.** 11 (4), 311-325, 2007.
96. RODGERS, R. J; JOHNSON, N.J.T. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 52: 297-303, 1995.
97. RODGERS, R. J; CAO, B.J; DALVI, A; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Basilian Journal of Medical and Biological Research**, 30: 289-304, 1997.
98. SADAMATSU, M., KATO, N., IIDA, H., et al. The 24-hour rhythms in plasma growth hormone, prolactin and thyroid stimulating hormone: Effect of sleep deprivation. **J Neuroendocrinol** 7:597-606, 1995.
99. SEDLAK, J. AND LINDSAY, R. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.** 25. 192-205., 1968.
100. SEI H, SAITOH D, YAMAMOTO K, MORITA K, MORITA Y. Differential effect of short-term REM sleep deprivation on NGF and BDNF protein levels in the rat brain. **Brain Res.** Sep 22;877(2):387-90, 2000.
101. SIES, H. **Angew. Chem. Int.**, 25, 1058, 1986.
102. SIES H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Radical Biology & Medicine**, London, v. 4, p. 313-323, 1993.
103. SILVA, H.R., KAMEDA, S.R., CARVALHO, C.R., TAKATSU-COLEMAN, A.L., NIIGAKI, S.T., ABILIO V.C., et al. Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus maze test in mice. **Psychopharmacology**, 176:115-22. Back to cited text no. 4, 2004.

104. SINGH, A., KUMAR, A. Protective effect of alprazolam against sleep deprivation-induced behavior alterations and oxidative damage in mice. **Neuroscience Research**, 60, 372-379, 2008.
105. SMITH, C., KELLY, G. Paradoxical sleep deprivation applied two days after end of training retards learning. **Physiology & Behavior** 43, 213–216, 1998.
106. SPIEGEL, K., TASALI, E., PENEV, P., et al. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. **Ann Intern Med** 141:846-850, 2004.
107. STEIGER, A. Neurochemical regulation of sleep. **J. Psychiatr. Res.** 41 (7), 537-552, 2007.
108. STRASSMANN, R.J., QUALLS, C.R., LISANSKY, E.J., PEAKE, G.T. Elevated rectal temperature produced by all-night bright light is reversed by melatonin infusion in men. **J Appl Physiol.**, 71, pp. 2178-2182, 1991.
109. SUCHECKI, D., LOBO, L.L., HIPÓLIDE, D.C., TUFİK, S. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods paradoxical sleep deprivation. **JSleep Res.** 7, 276-281, 1998.
110. SUCHECKI, D., TIBA, P.A., TUFİK, S. Hormonal and behavioral responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. **J. Neuroendocrinol.** 14, 549-554, 2002.
111. SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. **New Horizons**, 3(1): 2-32, 1995.
112. TAN, D.X., CHEN, L.D., POEGGELER, B., MANCHESTER, L.C., REITER, R.J. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrinology Journal**, v.1, p.57-60, 1993.
113. TAN, D.X., REITER, R.J., MANCHESTER, L.C., YAN, M.T., EL-SAWI, M., SAINZ, R.M., MAYO, J.C., KOHEN, R., ALLEGRA, M., HARDELAND, R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current Medicinal Chemistry**, v.2, p.181-197, 2002.
114. TILLEY, A.J., EMPSON, J.A. REM sleep and memory consolidation. **Biological Psychology** 6, 293–300, 1978.

115. VAN SOMEREN, E.J. More than a marker: interaction between the circadian regulation of temperature and sleep, age-related changes, and treatment possibilities. **Chronobiol Int.**, 17(3), pp. 313-354, 2000.
116. VIDAL, E.P. Avaliação dos efeitos comportamentais no labirinto em cruz elevado de ratos alojados individualmente por diferentes períodos de tempo.
117. VOGT, W. **Free Radical Biol. Med.**, 18, 93, 1995.
118. YAMADA, K., NODA, Y., NAKAIAMA, S., KOMORI, Y., SUGIHARA, H., HASEGAWA, T., NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in learning and memory and monoamine metabolism in the rat brain. **Br. J. Pharmacol.**, 115: 852-8, 1995.
119. ZOU, C.G., AGAR, N.S., JONES, G.L. Oxidative insult human red blood cells induced by free radical inhibitor AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. **Life Science**, v. 69. 75-86. Oxford, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)