

**MURILO DÁTILLO**

**A PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL EM RATOS ESTÁ ASSOCIADA A  
ATROFIA MUSCULAR E DÉFICIT NA RECUPERAÇÃO MUSCULAR**

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

São Paulo  
2011

**MURILO DÁTILLO**

**A PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL EM RATOS ESTÁ ASSOCIADA A  
ATROFIA MUSCULAR E DÉFICIT NA RECUPERAÇÃO MUSCULAR**

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

Orientador: Marco Túlio de Mello

Co-orientadora: Alessandra Medeiros

São Paulo  
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

**Chefe do Departamento de Psicobiologia**

Profa. Dra. Maria Lucia Oliveira de Souza Formigoni

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia**

Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

# MURILO DÁTILLO

## A PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL EM RATOS ESTÁ ASSOCIADA A ATROFIA MUSCULAR E DÉFICIT NA RECUPERAÇÃO MUSCULAR

### **Presidente da banca:**

Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

Profa. Dra. Stela Márcia Mattiello

### **Suplente:**

Prof. Dr. Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

**Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

Esta dissertação foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com o apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP) e Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob processo 2009/11056-1 e CEPID#98/14303-3.

## Dedicatória

Aos meus pais, sou agradecido por todo o empenho em me ensinar e me guiar no caminho da vida. Se posso ser considerado alguém hoje, devo tudo a vocês, que são pessoas do bem e, sem dúvida, os melhores criadores que poderíamos ter. Que nossos laços sejam eternizados além dessa vida!

À Pri, irmãzinha 6 anos mais velha. Obrigado por ser a irmã amiga que é e compartilhar tudo comigo. Obrigado por me dar a oportunidade de ser seu confidente. Topa ser minha irmã nas outras vidas também, caso isso realmente exista?

À Vivizinha, amor da minha vida, princesa do meu coração e amiga de todo dia. História para contar é o que temos e posso dizer que é uma história de eventos felizes que nunca terá fim. Case comigo, nessa e em todas as vidas que existir? Obrigado por todo apoio e suporte, você é parte do que sou.

Ao grande amigo e orientador Marco Túlio, que consegue motivar os alunos e pessoas que o rodeiam de forma ímpar. Seus conhecimentos, valores e atitudes são virtudes admiráveis e que servem de inspiração à todos, inclusive à mim. Você é fonte de inspiração para minha vida e espero que esse vínculo possa ser muito duradouro. Obrigado por todas as oportunidades, por ter aberto as portas da Casinha e por ter permitido o desenvolvimento de todas as atividades. Sem você, nada disso também seria possível, assim como para todos que passaram ou passarão pelo seu grupo. Obrigado por sempre nos impulsionar à vitória. Para você, obrigado e parabéns, no plural.

À Cibele e Ioná, por toda a oportunidade dada, pois sem vocês nada disso e todo o restante que me aconteceu seria possível. Vocês me abriram portas para locais jamais imaginados e a chance de crescer na profissão da Nutrição. Musas da Nutrição vistas a partir dos olhos de um estudante que, de maneira mágica e inesperada, permitiram que convivesse ao lado desses ícones. Grandes semeadoras da inspiração, obrigado por tudo e parabéns pelos ensinamentos.

Querida Hanna, ou Ranna Carmen, a pluralidade do obrigado também se aplica perfeitamente à você. Só de pensar que um simples Twix pode ter sido o gatilho para tantas coisas boas, poderíamos então pensar em distribuir Twix para mais pessoas, né? Você é especial como pessoa e como profissional, com curiosidade invejável e motivante, com ombro sempre apto à receber cabeças e com coração maior que a plantação de Ornélias de seu pai. Que muitas atividades frutíferas, ou ornelíferas, sejam colhidas e, sempre da forma mais engraçada possível. A nova tendência da ciência está começando? Vai mais um Twix aí? *Becoming Insane*.

Alessandra Medeiros, você é a prova viva que a teoria do mercúrio existe. Sua participação em nosso grupo é algo impossível de se traduzir em agradecimentos pelos conhecimentos científicos e metodológicos. O meu (e nosso) obrigado é por todos os momentos de ensinamentos, risadas e amizade. Ícone da ciência e que permitiu vivenciar, e muito, o jardim do outro lado do muro. Obrigado por tudo e por fazer parte de nosso grupo, ainda franco atirador, mas que está em busca da equipe de elite.

## Agradecimentos

Um especial agradecimento ao Sergio Tufik, por todo o exemplo de ciência e empreendedorismo. Com certeza, todas as oportunidades dos alunos do Departamento de Psicobiologia são consequência de seu brilhantismo.

Grande Marcos, de Itapira, obrigado por todas as noites sem dormir e por me deixar participar um pouco da sua formação, se é que me permite. Saber que sua entrada no Mestrado foi consequência dos experimentos realizados juntos é uma satisfação para mim. Pode ser que tenha demorado um pouco mais do que esperava, mas tenho certeza que esse é seu momento. Sou muito grato a você e um de seus maiores fãs!

Grande Helton, menino do Rio e corredor da Psicobio. Obrigado por me deixar fazer parte de sua história no CEPE e no Departamento, momento este que estará aí em breve. Obrigado por ter vindo falar comigo na aula! Abrir mão de tudo o que abriu e ralar como vem ralando é prova viva do acerto que fez na vida, pois você conquista quem está ao seu redor. Valeu por todas as noites em claro e caronas. Te admiro, muleque!

Glorinha, obrigado por sempre nos receber com aquele sorriso impecável no rosto e por compartilhar os sucos Clight. A simpatia do grupo começa por você. Parabéns!

À todos os amigos do CEPE, as conversas e compartilhamento de bons momentos foram demais. Vocês que fazem a cara do CEPE ser como é, ou seja, o lugar mais gostoso de conviver.

À todos os funcionários do CEPE, obrigado por sempre estarem disponíveis para nos ajudar e compartilhar bons momentos.

A todos os funcionários da AFIP, obrigado por todo o suporte.



Patrícia Chakur Brum, sou muito grato por ter nos recebido em seu laboratório e ter permitido que nossa história pudesse começar a ser escrita. Obrigado também por ser parte de minha banca, pois é um orgulho para mim.

Aline, Katt, Max e Pamela, obrigado pelos auxílios no laboratório e por nos ajudarem a tornar esse início, mesmo que modesto, possível.

Tânia Rodrigues e Heloísa Guarita, musas da Nutrição. Agradecer à vocês é um marco em minha vida, pois é fruto de que pude conhecê-las e conviver parte de suas experiências de vida, pessoas de humildade singular e coração gigantesco, com amor imenso pela profissão. Parabéns ao legado construído por vocês.

Kil Sun Lee, obrigado por todos os ensinamentos, hora extra despendida no laboratório e por acompanhar os experimentos. Você faz parte da história de nosso grupo e, em nome de todos, agradeço mais uma vez.

Luciana Guariniello, obrigado por ter me dado a oportunidade de conhecê-la, dividir suas experiências conosco e de me ajudar em todas as etapas. Com certeza, já faz parte de nosso grupo.

Ricardo Cassilhas e Victor Tarini, somos gratos por nos auxiliarem em partes fundamentais do experimento.

À Elen Miyabara, por ter prontamente e humildemente me recebido em seu laboratório, compartilhando seus conhecimentos de maneira impecável. Muito obrigado!

Sueli, Diva, Laurinha, obrigado por todo auxílio no laboratório.

Vânia D'Almeida, obrigado por compartilhar experiências comigo e por participar de minha qualificação. Foi uma honra, e sempre será.

Andrea Maculano Esteves, obrigado por ser membro da minha qualificação e por fazer parte do mesmo grupo que você.

Ligia Mendonça, obrigado por ter me acompanhado no Mestrado e ter participado de minha qualificação.

Obrigado à Magda Bignotto, por todos os auxílios, novas formas de enxergar o FAX e pelas risadas junto com nosso grupo.

Marilde, muito obrigado por todos os ensinamentos na manipulação dos animais.

Juliana Carlota e Deinha, obrigado por sempre estarem disponíveis para nos fornecer animais de experimentação e por organizarem de maneira primorosa esse processo.

Paulinha Araújo, personalidade cheia de humildade; Ricardo Borges Machado, exemplo de pesquisador; e Márcia Cristina Feres, ícone das dosagens bioquímicas, muito obrigado pelos auxílios nas análises sanguíneas.

Monica Andersen, obrigado pelos ensinamentos na pesquisa básica.

Aos amigos da secretaria do Departamento de Psicobiologia, especialmente Julio, Mara, Valéria, Érika e Nereide, obrigado por todos os auxílios.

À Alidar e família, obrigado pelas conversas, incentivo, risadas e, mais que tudo, amizade impecável e de total confiança. Ali, você é admirável por muitos, pois é exemplo de altíssima competência, mas que nós, homens, temos que tomar cuidado, pois há uma grande chance de o mundo ser dominado pelo sexo oposto, rsrs!!! Está em nossos corações e lembranças, sempre. Mas é abril? Junho? Julho?

Ao grande Professor José Peralta, pela primeira inspiração na área da Nutrição.

Sou grato à todos os professores do Centro Universitário São Camilo, em especial Sandra Chemin, Lucy, Tuca, Renata Basso, Roberta de Medeiros, Luciana Rossi, Luciana Garcia, por permitirem minha formação inicial na Nutrição.

Obrigado Stela Márcia Mattiello e Anselmo Sigari Moriscot pelo imediato aceite na participação da avaliação deste trabalho, que é o início mais modesto de uma linha de pesquisa. Poder contar com vocês vai muito além da nota à ser atribuída e isso merece um imenso obrigado, em meu nome, de meu orientador e de todos de nosso grupo.

# Sumário

<b>Dedicatória</b>	<b>vi</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>viii</b>
<b>Sumário</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b>	<b>xvi</b>
<b>Resumo</b>	<b>xviii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 O sono de ratos	3
2.2 Funções do sono	4
2.3 Privação do sono: Aspectos históricos	6
2.4 Métodos de privação de sono paradoxal em ratos	8
2.5 Privação de sono em ratos: Respostas hormonais, gasto energético e composição corporal	9
2.6 O músculo esquelético	12
2.7 A lesão muscular e o processo de regeneração muscular	14
2.7.1 Modelos animais de indução da lesão muscular	14
2.7.2 Características morfológicas da lesão e regeneração muscular	15
2.7.3 Células satélites e regeneração muscular	17
2.7.4 Fatores hormonais envolvidos na regeneração muscular	19
2.7.4.1 IGF-1	19
2.7.4.2 Testosterona	20
2.7.4.3 Glicocorticóides	21
2.7.4.4 Miostatina	23
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>25</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>27</b>
5.1 Animais experimentais e condições ambientais	27
5.2 Protocolos experimentais	28
5.2.1 Experimento 1	28
5.2.1.1 Amostra e métodos	28
5.2.2 Experimento 2	29
5.2.2.1 Amostra e métodos	29
5.3 Procedimentos experimentais	30
5.3.1 Protocolo de criolesão	30
5.3.2 Protocolo de privação de sono paradoxal	31
5.3.3 Procedimentos para eutanásia	33
5.3.4 Dosagens sanguíneas	33

5.3.5	Processamento dos tecidos e análise histomorfométrica	33
5.3.6	Análise estatística	34
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
6.1	Experimento 1	35
6.2	Experimento 2	39
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
7.1	Privação de sono paradoxal e atrofia muscular: Caracterização das hipóteses	44
7.2	Privação de sono paradoxal e regeneração muscular: Caracterização das hipóteses	48
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>52</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>53</b>
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>68</b>

## Lista de figuras

<b>FIGURA 1.</b> DEMONSTRAÇÃO DO MÚSCULO <i>TIBIALIS ANTERIOR</i> DANIFICADO (ESQUERDA) E SADIO (DIREITA)	31
<b>FIGURA 2.</b> APARATO UTILIZADO PARA REALIZAÇÃO DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL	32
<b>FIGURA 3.</b> CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA	36
<b>FIGURA 4.</b> CONCENTRAÇÕES DE CORTICOSTERONA	36
<b>FIGURA 5.</b> CORRELAÇÕES ENTRE (A) DELTA DE VARIAÇÃO DA MASSA CORPORAL (g) E TESTOSTERONA (ng/dL); (B) MASSA DO <i>TIBIALIS ANTERIOR</i> (g) E TESTOSTERONA (ng/dL); (C) ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS DO <i>TIBIALIS ANTERIOR</i> ( $\mu\text{m}^2$ ) E TESTOSTERONA (ng/dL)	37
<b>FIGURA 6.</b> CORRELAÇÕES ENTRE (A) DELTA DE VARIAÇÃO DA MASSA CORPORAL (g) E CORTICOSTERONA (ng/mL); (B) MASSA DO <i>TIBIALIS ANTERIOR</i> (g) E CORTICOSTERONA (ng/mL); (C) ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS DO <i>TIBIALIS ANTERIOR</i> ( $\mu\text{m}^2$ ) E CORTICOSTERONA (ng/mL)	38
<b>FIGURA 7.</b> CONCENTRAÇÕES DE TESTOSTERONA	40
<b>FIGURA 8.</b> CONCENTRAÇÕES DE CORTICOSTERONA	40
<b>FIGURA 9.</b> ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DO MÚSCULO <i>TIBIALIS ANTERIOR</i> SADIO	41
<b>FIGURA 10.</b> ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DO MÚSCULO <i>TIBIALIS ANTERIOR</i> DANIFICADO	42
<b>FIGURA 11.</b> CORTES TRANSVERSAIS DOS MÚSCULOS <i>TIBIALIS ANTERIOR</i> SADIO E DANIFICADO. HE, 40X	43

## Lista de tabelas

**TABELA 1.** MASSA CORPORAL, MASSA MUSCULAR E ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS DO MÚSCULO *TIBIALIS ANTERIOR* \_\_\_\_\_ 35

**TABELA 2.** MASSA CORPORAL E MASSA DOS MÚSCULOS *TIBIALIS ANTERIOR* SADIO E DANIFICADO \_\_\_\_\_ 39

## Lista de abreviaturas e símbolos

<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrófico
<b>Akt</b>	Proteína quinase B
<b>AST</b>	Área de secção transversa
<b>CTRL</b>	Grupo Controle
<b>D-CTRL</b>	Grupo Controle do experimento 2
<b>D-CTRL-RB</b>	Grupo controle do D-RB
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>D-PSP</b>	Grupo privado de sono paradoxal do experimento 2
<b>D-RB</b>	Grupo privado de sono paradoxal e submetido ao rebote de sono
<b>EEG</b>	Eletroencefalograma
<b>eIF4E</b>	Fator de iniciação da tradução de eucariotos
<b>GC</b>	Glicocorticóides
<b>GDF-8</b>	Fator de crescimento e diferenciação-8
<b>GH</b>	Hormônio do crescimento
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
<b>MAFbx</b>	Muscle atrophy F-box
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MPC</b>	Células precursoras miogênicas
<b>MRF</b>	Fatores regulatórios miogênicos
<b>mTOR</b>	Alvo da rapamicina em mamíferos
<b>MuRF1</b>	muscle RING finger protein 1
<b>NREM</b>	Non rapid eye movement
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de proliferação celular
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 quinase
<b>PS</b>	Privação de sono
<b>PSP</b>	Privação de sono paradoxal



<b>REM</b>	Rapid eye movements
<b>RNAm</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TA</b>	<i>Tibialis anterior</i>
<b>TAD</b>	<i>Tibialis anterior</i> danificado
<b>TAS</b>	<i>Tibialis anterior</i> sadio
<b>TGF-β</b>	Fator transformador de crescimento-β
<b>4E-BP1</b>	Proteína de ligação 1 do fator de iniciação eucariótico 4

## Resumo

**Introdução:** A privação de sono paradoxal (PSP) em ratos é capaz de induzir reduções da massa corporal e de gordura corporal, fato este atribuído ao aumento da secreção de hormônios do eixo hipófise-adrenal. Considerando que a PSP também está associada com diminuição de hormônios anabólicos, a musculatura esquelética também pode ser fortemente influenciada, respondendo com atrofia e podendo prejudicar sua recuperação após determinado dano. **Objetivos:** Avaliar a massa corporal, perfil de secreção hormonal e a histomorfometria do músculo *tibialis* anterior (TA) submetido ou não a criolesão. **Material e método:** Para alcançar os objetivos propostos, foram realizados dois experimentos. No primeiro, 9-10 ratos Wistar machos, com aproximadamente 3 meses de idade foram submetidos a PSP por 96 horas (Grupo PSP) ou ao período de sono por 96 horas (Grupo CTRL). No segundo experimento, 8-9 ratos Wistar machos, com aproximadamente 3 meses de idade foram submetidos ao protocolo de criolesão, para indução da lesão no músculo TA e, subsequentemente, submetidos a: 1) PSP por 96 horas (Grupo D-PSP) ou período de sono por 96 horas (Grupo D-CTRL); ou 2) PSP por 96 horas seguida de 96 horas de sono *ad libitum* (período de rebote de sono – Grupo D-RB) ou ao período de sono por 192 horas (Grupo D-CTRL-RB). Foram realizadas dosagens de corticosterona e testosterona sanguíneas e análise histomorfométrica do músculo TA sadio e danificado. **Resultados:** No experimento 1 foi possível observar redução da massa corporal, da massa muscular e da AST do TA no grupo PSP, além de aumento da concentração de corticosterona e diminuição da concentração de testosterona. Já no experimento 2, a histomorfometria do músculo TA sadio e os parâmetros hormonais foram similares ao experimento 1 no grupo D-PSP, enquanto que o TA danificado apresentou redução da sua massa somente no grupo D-PSP. Embora a AST da região danificada tenha sido menor em relação ao TA sadio no grupo D-PSP, a mesma não foi diferente do TA danificado do grupo D-CTRL. Por outro lado, o grupo D-RB apresentou massa e AST do TA maior que o grupo D-PSP, mas menor que os grupos D-CTRL e D-CTRL-RB. **Conclusão:** A PSP está associada com atrofia do músculo TA e prejuízo da sua capacidade de recuperação após dano induzido por criolesão, possivelmente pelas respostas hormonais associadas a PSP.

## 1 INTRODUÇÃO

O sono é uma condição inerente à vida da maioria dos seres vivos e cada vez mais vem sendo demonstrado o papel desempenhado por ele sobre as funções orgânicas, assim como os prejuízos fisiológicos decorrentes de sua ausência. Essas questões se tornam altamente relevantes em função da diminuição progressiva do sono que a população moderna vem sofrendo nos últimos anos, fato este associado com diversos problemas à saúde. Na literatura, já existem evidências apontando que o débito de sono está relacionado com alterações da função cognitiva, imunocompetência, regulação da pressão arterial, estresse oxidativo, metabolismo de glicose, comportamento alimentar e regulação da massa corporal (Tufik e cols., 2009).

Nesse sentido, modelos experimentais se tornam ferramenta fundamental para melhor elucidação desses aspectos, destacando-se o uso de ratos, já que algumas técnicas foram previamente desenvolvidas para realização da privação de sono (PS) nesses animais. Em nosso laboratório, um modelo amplamente utilizado é o da plataforma múltipla modificada, para privação seletiva de sono paradoxal, o qual corresponde ao sono REM (do inglês *rapid eye movements*) de humanos (Andersen e cols., 2005; Suchecki e Tufik, 2000). Tanto nesse modelo quanto em outros disponíveis na literatura, envolvendo a privação de sono paradoxal (PSP) ou mesmo total, um fenômeno classicamente observado é o aumento da ingestão alimentar e paralela diminuição da massa corporal (Martins e cols. 2010; Hipólido e cols., 2006; Suchecki e Tufik, 2000; Rechtschaffen e cols., 1983).

A PS em animais também está relacionada com alterações no perfil de secreção hormonal, com aumento imediato de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Martins e cols., 2010; Andersen e cols., 2005) e redução marcante de hormônios anabólicos, tais como testosterona (Andersen e cols., 2005), hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) (Everson e Crowley, 2004). Assim, é notório que tal padrão hormonal favoreça a redução de massa corporal, a qual é representada, principalmente, pela diminuição de gordura corporal

(Hipólide e cols, 2006). Mas cabe destacar que, além de atividade lipolítica, tais respostas impõem um ambiente potencialmente proteolítico, principalmente da musculatura esquelética. Entretanto, não existem dados prévios na literatura avaliando esta questão.

Na tentativa de elucidar parte dessa relação, Nedeltcheva e cols. (2010) publicaram um elegante artigo, envolvendo seres humanos, que abriu caminho para um grande questionamento e forneceu importante base de sustentação para o envolvimento do débito de sono na ocorrência de prejuízos musculares. Neste estudo, foi verificado que, quando indivíduos com excesso de massa corporal foram submetidos a períodos de sono normal (8,5 horas) ou reduzido (5,5 horas) por 14 dias, com dieta hipocalórica, a redução de massa corporal foi igual entre os grupos. Esse dado parcial sugere que, mesmo na condição de débito de sono, o fato determinante para redução da massa corporal é o débito calórico. Entretanto, o dado interessante foi obtido a partir da avaliação da composição corporal desses indivíduos, evidenciando-se que o grupo restrito de sono apresentou 55% a menos de perda de gordura e 60% a mais de perda de massa magra que o grupo com período de sono normal. Assim, sugere-se exatamente que o sono pode interferir de maneira muito importante na regulação da massa muscular.

Frente a esse panorama, Dattilo e cols. (2011) publicaram, pioneiramente, uma hipótese relacionando o sono com a recuperação muscular esquelética, primeiro sugerindo que a diminuição do tempo de sono impactaria negativamente a fisiologia muscular e, assim, prejudicaria a recuperação deste tecido após determinado dano. Frente à necessidade da musculatura esquelética em receber, primeiramente, sinais ativadores das etapas iniciais da regeneração muscular (ativação, proliferação e diferenciação das células satélites) e, conjuntamente, estímulos anabólicos para crescimento e maturação das fibras musculares, a PS pode ser uma condição que contrapõe tais respostas. Inicialmente, níveis aumentados de hormônios catabólicos, como o cortisol (ou corticosterona em ratos), poderiam ser capazes de interagir com outros hormônios envolvidos na ativação ou inibição da síntese protéica, favorecendo a degradação protéica e inibindo a ativação das células satélites.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O sono de ratos

O rato, mamífero da ordem *Rodentia*, compreende várias espécies, destacando-se o rato marrom (*Rattus norvegicus*) e o rato preto (*Rattus rattus*), presentes em todas as latitudes do mundo. O rato mais comum nos laboratórios de pesquisa é a variedade albina, denominada rato *albino*, ou *Wistar*. Essa linhagem, cognominada *Rattus norvegicus alinus*, caracteriza-se pela ausência completa do pigmento melanina nos pêlos e na íris. Devido à sua grande resistência e capacidade de sobrevivência em condições adversas, o rato vem sendo objeto de pesquisas biológicas há mais de 100 anos.

O rato foi introduzido na pesquisa sobre sono e alerta na década de 1960. Os ciclos de vigília e sono desse animal foram minuciosamente estudados e descritos nesse período por pesquisadores brasileiros (Timo-laria e cols., 1970), contribuindo para que ele se tornasse a espécie mais utilizada nas pesquisas a respeito desse tema nesses últimos 30 anos. A utilização do rato, no estudo do sono, passou a justificar-se plenamente quando se demonstrou que ele, além de ser um animal que dorme aproximadamente 13 horas, manifesta quase todas as fases do sono humano (Timo-laria e cols., 1970).

Assim como ocorre com os eletroencefalogramas de seres humanos, os electrocorticogramas dos ratos e de muitos outros animais também se manifestam com oscilações rápidas (dessincronização) e lentas (sincronização). Em decorrência dessa distinção básica quanto à frequência e amplitude das ondas, costuma-se dividir o sono em dois estados fundamentais que são o *sono de ondas lentas*, ou *sono sincronizado*, e *sono dessincronizado*, ou *sono paradoxal*, ou, ainda, sono REM, tal como acontece em ratos (Timo-laria e cols., 1970; Hoshino e Guimarães-Toloi, 1995). Assim, atualmente é aceito que em electroscilograma do ciclo vigília-sono do rato pode-se detectar os seguintes estágios: (a) vigília atenta ou ativa, (b) vigília lenta ou relaxada, (c) sono

sincronizado ou sono de ondas lentas, fase SS<sub>I</sub>, (d) sono de ondas lentas, fase SS<sub>II</sub>, (e) sono de ondas lentas, fase SS<sub>III</sub>, (f) sono pré-paradoxal e (g) sono paradoxal.

A sequência de ocorrência dos estágios do ciclo vigília-sono no rato não é fixa, isto é, atingida uma fase, o sono pode evoluir para a seguinte ou retornar a uma anterior. Isso torna a classificação das sequências de evolução das fases do sono uma descrição de natureza estatística. Apesar desse fato, é possível dizer que a evolução retrógrada das fases é comum nos primeiros ciclos de sono, mas as sequências das fases se tornam mais regulares à medida que o sono se prolonga.

## **2.2 Funções do sono**

A literatura ao longo dos anos tem evidenciado que o sono tem funções fisiológicas importantes, mas isso não têm sido facilmente esclarecido e, até os dias atuais, permanecem muitas questões a serem respondidas a respeito da pluralidade do benefícios do sono (Chen & Kushida, 2005).

O modelo restaurador foi uma das primeiras teorias sobre a função do sono, servindo para recuperar ou reverter os processos bioquímicos e fisiológicos degradados durante o estado de vigília, restaurando, assim, a capacidade do organismo. De acordo com Lavie (1993), a origem deste modelo data do período clássico grego e encontra adeptos até hoje, sendo Hess (1931) seu defensor mais clássico. Dados de animais privados de sono apóiam esta teoria por apresentar, geralmente, um sono mais consolidado e mais longo no período de recuperação (Heller, 1988; Bonnet e cols., 1991).

Outro modelo a respeito da função do sono refere-se ao modelo adaptativo, que considera o sono como um ritmo biológico, sugerindo um comportamento quase que instintivo visando a sobrevivência frente às pressões ambientais (Webb, 1974).

Embora as teorias possam auxiliar a compreensão da função do sono, elas são incompletas e foi observando justamente este ponto que Daan e cols. (1984) propuseram um novo modelo, chamado de modelo de dois fatores, onde o sono apresenta tanto um componente restaurador quanto um componente temporal do ritmo biológico. Outro modelo foi sugerido na sequência e, além de incluir os já citados anteriormente, acresceu o aspecto comportamental do sono, considerando que os aspectos fisiológicos, psicológicos e ambientais deveriam ser contemplados para que o organismo pudesse sobreviver, justificando assim a plasticidade que o sono exibe e, por conseguinte, a importância dos efeitos da PS (Webb, 1974). Mais tarde, Krueger e Obal (1993) sugeriram a hipótese da teoria do grupo neuronal, utilizando argumentos com base no modelo restaurador e adaptativo, admitindo a participação dos processos humorais e das vias neurais na regulação do sono.

A discussão das funções do sono não pode ser realizada sem considerar seus estágios e suas características específicas. No sono de ondas lentas, por exemplo, observa-se maior liberação do GH (Van Cauter e cols., 2004), sugerindo uma maior participação desse estágio na restauração física. Por outro lado, embora não seja consenso, alguns estudos sugerem que o sono REM possui relação com a consolidação da memória, sugerindo que as informações aprendidas no transcorrer do dia podem ser consolidadas durante a noite de sono (Roeths e Roth, 2000). Além disso, outros aspectos têm sido observados, assim como proposto por Kavanau (1996), sugerindo que a hipotonia muscular do sono poderia permitir um reforço endógeno dos circuitos motores pela ativação sináptica.

Muitas teorias sugerem um papel do sono não-REM (NREM) na conservação de energia e na recuperação do sistema nervoso. Já as teorias do sono REM têm sugerido que o papel desse estágio está centrado particularmente na sua ativação periódica cerebral durante o sono, refletindo assim, a sua participação (em menor escala) nos processos recuperativos e na regulação emocional. Entre os mamíferos, a quantidade e a natureza do sono estão correlacionados com a idade, com o tamanho corporal e com as variáveis ecológicas como, por exemplo, o ambiente em que os animais vivem (terrestre ou aquático). O sono pode ser um período eficiente

para completar um número considerável de funções, mas variações na sua expressão indicam que essas funções podem ser diferentes entre as espécies (Siegel, 2005).

É possível que com os avanços da biologia molecular se possa determinar com precisão a função do sono a cada nível biológico organizado, desde os genes e processos intracelulares até aos neurônios e sistemas envolvidos no controle do movimento, comportamento, cognição e funções autonômicas (Chen e Kushida, 2005).

### **2.3 Privação do sono: Aspectos históricos**

A PS pode ser definida como a remoção parcial ou supressão do sono em um organismo (Chen e Kushida, 2005). Historicamente, estudos sobre a PS tiveram início com os experimentos de De Manacéine (1894). Ela demonstrou que filhotes e cães adultos morriam após alguns dias de PS, e que essa privação causava severas lesões no sistema nervoso central desses animais (Bentivoglio e Grassi-Zucconi, 1997). Daddi (1898) demonstrou que o cérebro de cães privados totalmente de sono apresentava degeneração neuronal no sistema nervoso central (SNC), concluindo que essas mudanças não foram específicas quando comparadas com o efeito das toxinas e dos agentes infecciosos. No mesmo ano, Agostine, baseado nos seus experimentos com dois cães totalmente privados de sono até à morte, concluiu que a PS total induzia progressiva exaustão da atividade psíquica. Os animais foram privados de sono em uma jaula de metal com sinos, e morreram com 12 e 17 dias. Tarozzi (1899) investigou os efeitos metabólicos da PS em quatro cães privados de sono (um dos animais também foi privado de alimento), demonstrando um aumento na eliminação de compostos nitrosos (no final da privação), tendo essa condição sido acompanhada por hipertermia. Em 1909, Ishimori iniciou a busca por substâncias hipnogênicas no SNC e, um ano mais tarde, Legendre e Piéron propuseram a teoria da hipnotoxina a partir dos achados de Ishimori, de que o sangue de cães privados de sono causava sono em animais normais. Em 1927, Kleitman encontrou redução nas células vermelhas do sangue e anormalidades neuronais em filhotes mantidos acordados de 2 a 7 dias.



Os resultados apresentados por esses estudos iniciais são questionáveis, particularmente devido aos métodos utilizados na época para manter os animais acordados. É bastante provável que tais resultados estejam relacionados com o estresse, interrupção do ritmo circadiano ou até mesmo com lesões sofridas pelos animais. É pertinente comentar que, com o passar das horas, fica mais difícil manter os animais acordados, ressaltando-se a importância de um adequado controle para evitar disparidades experimentais e questionamentos metodológicos (Dement e cols., 2005). Nesse sentido, Andersen e cols. (2004b) argumentaram que seguir normas e observar princípios éticos e práticos no uso de animais de experimentação são recomendações mínimas esperadas para uma pesquisa básica.

O primeiro estudo de PS reportado em humanos foi conduzido por Patrick e Gilbert (1896). Os autores privaram de sono indivíduos jovens de 88 a 90 horas e observaram prejuízos no tempo de reação, na habilidade motora voluntária e na habilidade em memorizar. Além disso, aumentos da massa corporal de episódios de alucinações visuais também foram relatados por um voluntário que também apresentou redução da temperatura corporal, embora o ritmo circadiano dessa variável estivesse preservado. Após o término do experimento, os voluntários dormiram por 10,5 a 12 horas e recuperaram a sua condição basal após acordar.

Anos mais tarde foram realizados alguns relatos do uso da PS como elemento de tortura durante a guerra da Coréia. Esses relatos lançaram a idéia de que a PS prolongada poderia levar a alterações mentais e deterioração física. Williams e cols. (1959) reportaram que homens alistados no exército apresentavam prejuízos no seu desempenho após um período de PS agudo. Esse resultado levou a conclusão de que o prejuízo no desempenho ocorreu principalmente devido a lapsos descritos como “breves períodos de não responsividade acompanhados por sonolência extrema e pelo declínio na amplitude do alfa EEG”. Não foram observados sinais ambíguos de psicose durante ou após o período da PS.

Outro estudo clássico envolvendo longo período de PS foi conduzido por pesquisadores da Universidade de Oklahoma, que monitoraram a vigília prolongada de

um *Disc Jockey* de Nova Iorque. Peter Tripp permaneceu acordado por 201 horas devido a estímulos constantes e, com poucos dias de PS, houve relatos de alucinações, além de ter apresentado paranóia, insistindo que havia a presença de um eletricista que havia colocado um eletrodo em seus pés. Na mesma época, o *Guinness Book of World Records* atestou que o recorde de permanência em vigília foi de 260 horas, no entanto, um cuidadoso monitoramento desse feito não foi bem documentado. Em 1964, um aluno de 17 anos do segundo grau decidiu, para estudar os efeitos da ausência de sono para um projeto de ciências na escola e para quebrar o recorde mundial, privar-se de sono. Após 264 horas (11 dias) de PS, Randy Gardner foi conduzido ao hospital Naval americano onde seu sono foi continuamente registrado após o período de PS e durante as semanas seguintes. Na primeira recuperação de sono ele dormiu por 14 horas e 40 minutos, mas devido aos escassos conhecimentos da época, a quantificação exata do sono adicional durante a recuperação do sono não foi considerada relevante. Assim, nenhum efeito foi observado e ele não apresentou sinais de psicose (Gulevich e cols., 1966).

O primeiro experimento de PS seletiva foi realizado por Dement (1960). O autor conduziu a privação seletiva do sono REM e demonstrou que a privação desta fase do sono causava aumento do percentual do sono REM em relação ao seu basal, denominando esse fenômeno de efeito rebote. Além disso, foi observado que poderiam ocorrer distúrbios psicológicos, concluindo que a supressão dos sonhos poderia desencadear uma séria disfunção da personalidade. A existência do rebote de sono após um período de privação (Dinges e cols., 1987) demonstra que o sono não é um simples período de redução da atividade ou do alerta regulado pelo ritmo circadiano ou ultradiano (Siegel, 2005).

## **2.4 Métodos de privação de sono paradoxal em ratos**

A técnica de PSP envolve a estimulação do animal a partir de fatores externos em todos os eventos de sono paradoxal. Com base no que existe disponível atualmente, tal técnica é derivada de modificações feitas a partir do primeiro método

proposto por Jouvett e cols. (1964), para gatos, conhecido como *flower pot*. Pouco tempo após, Cohen e Dement (1965) adaptaram este método para a realização da PSP em ratos, o qual consistia na colocação de um rato em uma plataforma estreita (6,5 cm de diâmetro) rodeada de água. Dessa forma, a atonia muscular característica da fase do sono paradoxal consistiria na queda do animal na água, acordando-o. Como crítica a esse procedimento e a todas as técnicas empregadas na PS, ressalta-se que muitos estímulos aversivos ao animal são gerados para suprimir o sono paradoxal, podendo estes atuarem como fatores confundidores nas respostas fisiológicas decorrentes do procedimento.

Com o intuito de minimizar tais efeitos, o método da plataforma múltipla foi desenvolvido, o qual era composto pelo posicionamento de um único rato em um grande tanque com sete plataformas, evitando assim a imobilização do animal em uma única plataforma, permitindo sua deambulação (Van Hulzen e Coenen 1981). Anos depois, essa técnica foi aprimorada na intenção de eliminar o isolamento social vivenciado pelo animal (Nunes Jr e Tufik 1994), consistindo do posicionamento de 10 animais em 18 plataformas estreitas ou largas (para que servisse como controle do ambiente da privação), eliminando assim tanto o isolamento social quanto a restrição de movimentos. Esse procedimento é relativamente simples e permite a realização da PSP de diversos animais juntos. Em 2000, Suchecki e Tufik propuseram o método da plataforma múltipla modificada a partir do uso de grupos socialmente estáveis (10 animais provenientes de uma mesma caixa-moradia) ao invés de animais provenientes de diversas caixas-moradia, o que evidenciou menor nível de estresse induzido pela PSP.

## **2.5 Privação de sono em ratos: Respostas hormonais, gasto energético e composição corporal**

No Brasil, o Grupo do Sono do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP, ao longo dos anos, tem publicado diversos estudos com a temática da PSP, o que faz desse grupo referência nacional e internacional. O trabalho pioneiro realizado

por Tufik e cols. (1978) demonstrou que animais submetidos a PSP foram mais responsivos à apomorfina do que os controles não-privados, sugerindo que esse tipo de PSP induzia a uma supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos no cérebro. Na continuidade deste trabalho, o autor demonstrou que a agressividade observada nos ratos submetidos a PSP, mostrada pela apomorfina, estava relacionada com uma supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos (Tufik, 1981a), o que o levou a questionar se essa supersensibilidade não estaria relacionada ao *turnover* dopaminérgico (Tufik, 1981b). Mais tarde, Nunes Júnior e cols (1994a,b) observaram o aumento dos receptores dopaminérgicos D2 com a PSP, sugerindo uma supersensibilidade desse tipo de receptor, e que este fenômeno poderia explicar as mudanças previamente relatadas por Tufik (1978).

O Grupo de Sono ainda tem conduzido diversos outros trabalhos relacionados aos efeitos da PS nos trabalhadores em turnos (Crispim e cols., 2011; Padilha e cols., 2011; Mello e cols., 2000), níveis plasmáticos das endotelinas (Palma e cols., 2002), na memória (Bueno e cols., 2000), na atenção visual (Godoi e cols., 2005) e no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Hipólide e cols., 2006; Suchecki e cols., 1998, 2002a,b, 2003).

Quando destacadas as alterações hormonais que a PSP pode gerar nesses animais, nosso grupo tem publicado uma série de artigos a respeito desses aspectos (Hipólide e cols., 2006; Andersen e cols., 2005; Suchecki e cols., 1998, 2002a,b, 2003). Em ratos, é muito claro que o procedimento de PS, a partir das diferentes técnicas, é altamente estressor, pois além do fato de os animais serem impossibilitados de dormir, as técnicas empregadas geram algum tipo de estresse adicional, principalmente pela questão ambiental adversa. Nesse sentido, são observadas alterações hormonais marcantes, caracterizadas por diminuições no padrão de secreção de testosterona (Andersen e cols., 2004a, 2005), GH e IGF-1 (Everson e Crowley, 2004) e aumento das concentrações de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), noradrenalina e corticosterona (Martins e cols., 2010; Andersen e cols., 2004a, 2005; Suchecki e cols., 2002). Nesses trabalhos, tais resultados foram observados em apenas 4 dias de PSP mas, posteriormente, foi demonstrado que essas alterações

também são observadas em períodos menores de PSP. Andersen e cols. (2005) verificaram que diversos hormônios já se tornam alterados em apenas 24 horas de PS, os quais são representados pela diminuição de testosterona e aumento de progesterona, ACTH e corticosterona.

A secreção de hormônios do eixo hipófise-adrenal possui como indicador a ativação do sistema nervoso simpático e, assim, favorece também o aumento do gasto energético. Para esclarecimento deste aspecto, Pilcher e cols. (1990) realizaram um modelo experimental de inibição da secreção de noradrenalina a partir do uso de guanetidina e, mesmo nessa condição, foi observado aumento do gasto energético. Assim, os autores postularam a ocorrência de uma alteração do papel da noradrenalina para a adrenalina na participação dessa regulação metabólica, já que a adrenalina não se apresenta elevada após a PS (Martins e cols., 2010). Esses efeitos no gasto energético, embora sejam a partir de avaliações indiretas, têm sido extensamente observados em estudos envolvendo PS em longo prazo (Rechtschaffen e Bergmann, 1995; Everson e cols., 1989). Entretanto, tal fenômeno também já foi postulado de forma direta, assim como realizado por Koban e cols. (2005), a partir da análise direta do consumo de oxigênio.

Um segundo aspecto importante associado a PS, justificada pelo aumento do gasto energético, é a redução severa de massa corporal. Em diferentes modelos utilizados para supressão do sono, tais como o *disk over water* e método da plataforma múltipla, esse fenômeno se torna evidente, concomitante com o aumento da ingestão alimentar (Martins e cols., 2010; Hipólide e cols., 2006; Coenen e van Luijtelaar, 1985). Tal resposta fornece fortes indícios que o aumento do gasto energético inerente a PS em modelos animais promove aceleração do catabolismo de substratos energéticos (Martins e cols., 2010; Hipólide e cols., 2006; Everson e cols., 1989) para manutenção do funcionamento do organismo.

Com base nestes dados, pesquisadores do nosso departamento avaliaram a composição corporal de ratos submetidos a PSP por 96 horas a partir da carcaça deste animais (Hipólide e cols., 2006). Nesse estudo, a redução da massa

corporal foi acompanhada de diminuição da massa de gordura corporal e, paradoxalmente, aumento do conteúdo bruto de proteínas. Entretanto, ainda permanece em questão como o aumento de proteínas totais pode se tornar presente nessa condição, pois além da indução de hormônios com perfil catabólico, a PS de sono induz queda marcante de sinalizadores anabólicos envolvidos diretamente na regulação da síntese protéica.

Hormônios como testosterona (Zhao e cols., 2008) e IGF-1 (Rommel e cols., 2001) são amplamente conhecidos por apresentar atividades anabólicas muito expressivas na musculatura esquelética e, em contrapartida, a corticosterona (assim como glicocorticóides – GC – sintéticos) é um hormônio altamente proteolítico da musculatura esquelética, a partir de vias muito bem demonstradas na literatura (Zhao e cols., 2008; Menconi e cols., 2008). Sendo assim, é prudente considerar que a PS poderia ser uma condição implicada na atrofia muscular e prejudicar sua recuperação frente determinado dano, hipótese essa publicada por nós (Dattilo e cols., 2011). Entretanto, nenhum dado objetivou avaliar tal aspecto, caracterizando o ineditismo de nossa linha de pesquisa.

## **2.6 O músculo esquelético**

O tecido muscular esquelético é responsável, principalmente, pela locomoção, postura, movimentos de respiração, formando o maior tecido constituinte do corpo dos vertebrados. Em sua estrutura, o mesmo é formado por células capazes de desempenhar atividade contrátil, apresentando características estriadas, alongadas e estreitas, denominadas de fibras musculares estriadas. As fibras musculares estriadas esqueléticas são multinucleadas, sendo os núcleos localizados na periferia da fibra, abaixo da membrana plasmática. O diâmetro das fibras varia, em média, de 10 a 100µm, e o comprimento pode chegar até 10cm. A região citoplasmática, que nesse tecido é denominada como sarcoplasma, possui um citoesqueleto altamente desenvolvido, constituído, principalmente, por miofibrilas que se estendem por todo o comprimento da fibra (Dal Pai-Silva e Carvalho, 2007).

A característica estriada do músculo esquelético se dá a partir do arranjo ordenado das miofibrilas, sendo decorrente da organização das proteínas contráteis em unidades idênticas, os sarcômeros, que constituem a unidade contrátil fundamental da fibra muscular. Quando observada a fibra muscular em microscopia eletrônica, são encontradas faixas escuras e claras. As faixas escuras, denominadas bandas A, são assim consideradas, pois são anisotrópicas à luz polarizada, enquanto que as faixas claras, denominadas de bandas I, são isotrópicas à luz polarizada. No centro da banda A, pode-se observar uma fina faixa mais clara, a banda H, formada somente pelos filamentos espessos. Na região central da banda H, observa-se a linha M, formada por um arranjo hexagonal de proteínas que ligam filamentos espessos adjacentes. Por sua vez, a banda I é dividida por uma linha escura, o disco Z. A região da miofibrila, localizada entre dois discos Z, forma um sarcômero, com 2,5  $\mu\text{m}$  de comprimento. A banda I é constituída somente pelos filamentos finos, que se estendem da linha Z até o início da Banda H. Os principais componentes da banda A são filamentos espessos, localizados na região central do sarcômero (Dal Pai-Silva e Carvalho, 2007).

O músculo esquelético estriado adulto apresenta em sua composição uma mistura de fibras, com diferentes propriedades fisiológicas, variando desde o tipo de contração lenta e resistente à fadiga até fibras de contração rápida e não-resistentes à fadiga. Por sua vez, a proporção de cada fibra presente no músculo determina sua propriedade contrátil, mas o mecanismo básico para geração da contração é similar em todos os tipos de fibras. Esse fenômeno, por sua vez, é resultado do mecanismo de deslizamento do filamento de miosina (filamento grosso) sobre o filamento de actina (fino) após ativação neuronal (Huxley, 2000).

A característica das fibras musculares (de contração lenta ou rápida) é ditada pela sua estrutura e composição molecular, as quais podem ser identificadas como tipo I e tipo II, respectivamente. As fibras tipo I são ricas em mioglobina e têm cor vermelho-escura, enquanto que as fibras do tipo II contêm pouca mioglobina e, por isso, são de cor vermelho-clara. Por fim, as fibras do tipo II podem ser subdivididas nos tipos IIA, IIB e IIx de acordo com suas características funcionais e bioquímicas, sendo as

fibras do tipo IIB as mais rápidas e dependem principalmente da glicólise para obtenção de energia (Schiaffino e Serrano, 2002).

Para formação do músculo esquelético, cada fibra muscular é envolta por um tecido conjuntivo e, assim, agrupada em feixes, sendo também altamente vascularizado, pois o fornecimento de nutrientes essenciais é fundamental para manutenção de sua função. Uma vez a fibra muscular estando madura, ela é inervada por um neurônio motor e passa a expressar moléculas características para sua função de contração, diferindo principalmente nas isoformas de miosina e enzimas metabólicas (Chargé e Rudnicki, 2004).

## **2.7 A lesão muscular e o processo de regeneração muscular**

### **2.7.1 Modelos animais de indução da lesão muscular**

Embora as fases de degeneração e regeneração musculares sejam similares nos diferentes músculos após diversos tipos de lesão, a cinética e a amplitude de cada fase podem variar de acordo com a extensão da lesão, o músculo lesionado ou, então, o modelo animal empregado (Pavlath e cols. 1998; Roberts e cols., 1997).

O uso de miotoxinas, como bupivacaína, crotoxina e notexina permite a indução de lesão à musculatura e a avaliação das etapas da regeneração de forma reproduzível (Hall-Craggs, 1974; d'Albis e cols., 1988; Harris e Johnson, 1978), mas com amplo espectro de atividades biológicas, os quais ainda não são totalmente conhecidos. A notexina, por exemplo, é uma neurotoxina fosfolipase A2 presente no veneno da serpente *Notechis scutatus scutatus*, capaz de inibir a secreção de acetilcolina. Já a crotoxina, que também é um peptídeo isolado do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, da América do Sul, apresenta atividade inibitória específica sobre proteínas quinases-C, tendo como provável via de atuação a indução da despolarização e contração de células musculares, rompimento da organização das membranas e lise de diversos tipos de células (Chargé e Rudnicki, 2004).



Dentre os métodos alternativos à injeção de miotoxina, que, do ponto de vista fisiológico, podem ser ressaltados como mais relevantes, destacam-se a denervação-devascularização, a partir do transplante de um único músculo, e o esmagamento e ou congelamento (criolesão) do músculo. Todas essas técnicas são conhecidas por induzir o processo de regeneração muscular (Chargé e Rudnicki, 2004). Como exemplo, o transplante do músculo extensor digitorum longus no rato induz rápida degeneração (dentro de 2-3 dias) das fibras transplantadas, seguida de rápido aparecimento de fibras em processo de regeneração (dentro de 5 dias) e, por fim, com estrutura muscular normal em aproximadamente 60 dias (Hansen-Smith, 1983).

Já a criolesão é um modelo de indução do dano muscular que permite a avaliação de maneira precisa da capacidade de proteção do músculo esquelético contra determinada injúria, assim como sua capacidade de regeneração. Esse modelo é reconhecido por induzir necrose e subsequente regeneração em uma área bem delineada de músculos esqueléticos (Miyabara e cols., 2005,2006). Ao longo do processo de recuperação, que pode demorar cerca de 21 dias, podem ser evidenciadas as distintas fases, estruturais e funcionais, da adaptação muscular frente a lesão, incluindo a intensa necrose e edema, regeneração e restauração das características estruturais da morfologia do músculo esquelético normal (Miyabara e cols., 2005,2006).

### **2.7.2 Características morfológicas da lesão e regeneração muscular**

O tecido muscular esquelético adulto é um tecido estável com *turnover* do seu núcleo em taxas relativamente baixas, estimando-se que no máximo 1 a 2% dos mionúcleos são renovados a cada semana, em condições diárias normais (Schmalbruch e Lewis, 2000). No entanto, é fundamental destacar que a musculatura esquelética apresenta alta capacidade de ser regenerar, mesmo após lesões de grande magnitude.

Uma vez a musculatura sofrendo alterações de sua integridade, assim como acontece após a prática de exercícios físicos com predominância de contrações

excêntricas, ou em doenças genéticas, ou em modelos experimentais de indução de lesão muscular, a regeneração deste tecido é acompanhada de dois eventos importantes: a fase de degeneração e a fase de regeneração (Chargé e Rudnick, 2004).

A primeira fase da degeneração tecidual é a necrose gerada nas fibras musculares, causando rompimento do sarcolema e aumento da permeabilidade da miofibrila, elevando assim o nível de proteínas musculares no plasma. Além disso, é apontado também que o aumento do influxo de cálcio após dano ao sarcolema ou retículo sarcoplasmático resulta em perda da homeostase do cálcio e aumento de vias proteolíticas dependentes do cálcio, resultando na degeneração tecidual (Alderton e Steinhardt, 2000).

A fase inicial do dano muscular é normalmente acompanhada pela ativação de células mononucleadas, principalmente células inflamatórias e células miogênicas. Com base no que se tem conhecimento, é sugerido que fatores liberados pelas miofibrilas lesionadas ativam células residentes na musculatura que, por sua vez, produzem substâncias quimiotáticas sinalizadoras para a periferia, atraindo células inflamatórias circulantes para o local da lesão (Tidball, 1995). Dentre as classes de células do sistema imunológico, os neutrófilos são os primeiros a se infiltrarem no músculo lesionado, aumentando de forma expressiva sua quantidade, em cerca de 1 a 6 horas após a lesão induzida por miotoxina ou exercício físico (Orimo e cols., 1991). A presença de neutrófilos no local da lesão é uma etapa importante no processo de degradação das estruturas lesionadas, função essa mediada pelas espécies reativas de oxigênio (Close e cols., 2005). Como resposta secundária, cerca de 48 horas após a indução da lesão, se torna prevalente a infiltração de macrófagos no local lesionado (Orimo e cols., 1991), os quais atuarão no processo de fagocitose e, também, ativação das células miogênicas (Merly e cols., 1999).

O estabelecimento do quadro de degeneração e inflamação é considerado como “gatilho” para a regeneração muscular. Inicialmente, a proliferação celular é um evento necessário para a regeneração do músculo esquelético, destacando-se o papel das células miogênicas, que fornecerão novos mionúcleos para sua reparação

(Grounds e cols., 2002). É sustentado na literatura a contribuição das células miogênicas em processo de divisão para regenerar as miofibras que, quando diferenciadas, se fundem às fibras lesionadas existentes para reparação, ou então, formação de uma nova fibra (Snow, 1977).

Do ponto de vista morfológico, as miofibras recém formadas apresentam menor calibre, mionúcleo localizado centralmente, frequentemente basofílicas e com expressão de miosina de cadeia pesada neonatal (refletindo a formação *de novo* da miofibra) (Whalen e cols., 1990). Em secções longitudinais do músculo e em uma fibra muscular isolada, os mionúcleos centralizados são observados em porções muito discretas das fibras em regeneração ou ao longo de toda a nova fibra, sugerindo que a fusão celular não é difusa durante a regeneração, mas sim localizada somente na região previamente lesionada (Blaveri e cols., 1999). O processo de divisão da fibra (*fiber splitting*) ou ramificação também é um evento característico do músculo em processo de regeneração, ocorrendo provavelmente pela fusão incompleta das fibras em regeneração dentro da mesma lâmina basal (Blaveri e cols., 1999). Uma vez sendo observada a divisão de fibras, que é comumente observada em pacientes com doenças neuromusculares, em músculos hipertrofiados e em músculos de ratos idosos, um processo anormal da capacidade regenerativa se tornou presente (Chargé e cols., 2002). Entretanto, quando o processo de fusão de células miogênicas se torna completo, a nova miofibra formada aumenta em tamanho e o mionúcleo se desloca para a periferia. Sob condições normais, o músculo regenerado é morfológica e funcionalmente indistinguível de um músculo não lesionado.

### **2.7.3 Células satélites e regeneração muscular**

As células satélites são uma população de células mononucleares miogênicas não diferenciadas, encontradas entre a lâmina basal e o sarcolema das miofibras de diversos seres vivos (Mauro, 1961). Quando cultivadas *in vitro*, as células satélites apresentam características específicas que permitem distingui-las dos mioblastos embrionários e fetais (Hartley e cols., 1992).

A ativação das células satélites em resposta a um dano muscular é muito bem caracterizada. Ao longo do processo de regeneração muscular, essas células saem do seu estado normal de quiescência para um estado proliferativo, com sua ativação acontecendo cerca de 72 horas após a lesão, se tornando evidente já no quinto dia a etapa de diferenciação e fusão para formação de novas miofibras ou reparação de uma miofibrilha danificada. A ativação da célula satélite não é restrita ao local da lesão, permitindo que a lesão na região terminal de uma fibra ative as células satélites ao longo de toda a fibra, promovendo sua proliferação e migração até o local da regeneração (Schultz e cols., 1985).

Após exposição aos sinais provenientes do local lesionado, as células satélites quiescentes se tornam ativas e iniciam a etapa de proliferação, sendo normalmente denominadas como células precursoras miogênicas (MPC) ou mioblastos adultos. Em nível molecular, a ativação das MPCs é caracterizada pelo rápido *up-regulation* de dois fatores regulatórios miogênicos (MRF), o Myf5 e o MyoD (Kassar-Duchossoy e cols., 2004), enquanto que no estado quiescente, as células satélites não apresentam níveis detectados desses componentes. Após a ativação das células satélites, o *up-regulation* da MyoD acontece em apenas 12 horas e é detectável antes de qualquer sinal de divisão celular, a qual é representada pela expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Cornelison e cols., 2000). A expressão de MyoD e Myf5 após a lesão muscular tem sido muito bem demonstrada em vários modelos *in vivo* de regeneração muscular, assim como em vários tipos de músculos (Cooper e cols., 1999).

Após a fase de proliferação das MPCs, a expressão de Miogenina e *MRF4* (membros dos MRFs) está aumentada nas células em processo de finalização da etapa de diferenciação (Cornelison e cols., 2000) a qual é finalizada com a ativação de proteínas musculares específicas musculares, como miosina de cadeia pesada, e a fusão das MPCs para reparação do músculo danificado. A expressão de *MRF4* em mionúcleos de miofibras recentemente regeneradas ou novos miotubos após a fusão sugere um papel distinto do Myf5, MyoD e Miogenina, possivelmente na maturação da miofibrilha (Zhu e cols., 2000).

## 2.7.4 Fatores hormonais envolvidos na regeneração muscular

### 2.7.4.1 IGF-1

O IGF-1 é considerado fator essencial para o crescimento e desenvolvimento de vários tecidos. Mais recentemente, a regulação parácrina e autócrina desse hormônio e sua atividade, especificamente no desenvolvimento e reparação do tecido muscular esquelético, vêm sendo destacada. *In vitro*, o IGF-1 é capaz de atuar na regulação da expressão dos MRFs, contribuindo assim para a proliferação, diferenciação e fusão dos mioblastos (Vandenberg e cols., 1991). A manipulação da expressão dos níveis de IGF-1 dentro da célula muscular a partir de vários métodos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, possui como resultado o aumento da massa muscular em decorrência do aumento das quantidades de proteínas e de ácido desoxirribonucléico (DNA) (Chakravarthy e cols., 2000). Os efeitos anabólicos atribuídos ao IGF-1 são decorrentes tanto da ativação de células satélites para se proliferarem, fornecendo mais mionúcleos, quanto pelo seu papel de estimular a “real hipertrofia” (aumento da razão do volume citoplasmático:DNA) a partir do aumento da síntese protéica nas miofibras existentes (Musarò e cols., 1999).

O IGF-1, uma vez ligado ao seu receptor transmembrânico com atividade tirosina-quinase, é capaz de ativar duas vias conhecidas: primeira, a cascata mediada pelas proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que potencializa a proliferação dos mioblastos e das células satélites; e segunda pela via fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt) (Chakravarthy e cols., 2001; Rommel e cols., 2001), que gera ativação do alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin* – mTOR) e seus efetores proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA (p70S6K) e proteína de ligação 1 do fator de iniciação eucariótico 4 (4E-BP1) (Rommel e cols., 2001).

Seu envolvimento na ativação da síntese protéica é algo já muito bem demonstrado e se dá a partir de experimentos como o realizado por Bodine e cols. (2001a), onde expressão aumentada da Akt ativada em músculos de ratos adultos resultou em aumento do tamanho da fibra muscular em aproximadamente 60%.

Corroborando esse achado, a sinalização mediada pela Akt e mTOR também se torna ativada em músculos submetidos à resposta hipertrófica induzida pela sobrecarga, assim como em músculos em processo de recuperação após atrofia induzida por suspensão dos membros. Em contrapartida, quando realizado o bloqueio da mTOR, tais efeitos se tornam suprimidos (Bodine e cols., 2001a).

#### **2.7.4.2 Testosterona**

A testosterona, assim como todos os andrógenos, está envolvida na regulação dos órgãos reprodutores dos homens, desempenhando também importante papel anabólico em outros tecidos, como ossos e músculos (Yin e cols., 2003). Esse hormônio, que é o principal andrógeno circulante, é produzido pelas células de Leydig, nos testículos, após estimulação do hormônio luteinizante (Mooradian e cols., 1987). Seu perfil na corrente sanguínea é mantido dessa forma em decorrência do músculo esquelético apresentar deficiência da enzima  $5\alpha$ -redutase, que converte testosterona em dihidrotestosterona, sendo sua ação restrita aos tecidos reprodutores (Bhasin e cols., 2003).

As ações desempenhadas pela testosterona ocorrem a partir da sua ligação com o receptor de andrógeno e, assim, o complexo hormônio-receptor se liga a região promotora de genes-alvo que regulam a transcrição gênica. Os receptores de andrógenos, assim como outros receptores esteroidais, são compostos por domínios funcionais relativamente discretos, sendo (a) um domínio N-terminal, que regula a atividade transcricional, (b) um domínio central de ligação ao DNA, (c) uma pequena região “dobradiça” e (d) um grande domínio C-terminal para ligação com o andrógeno (Evans, 1988). O receptor de andrógeno modula a transcrição gênica a partir do reconhecimento e ligação aos elementos de resposta andrógênica (Freedman, 1992), atuando somente após a ligação com seu ligante (andrógeno), que induz sua dimerização, translocação nuclear e ligação ao DNA.

Diversos modelos experimentais já evidenciaram que a administração de testosterona ativa e recruta células satélites mantidas em estado quiescente (Joubert e Tobin, 1995), aumentando o número de células satélites (Joubert e cols., 1994) e de mionúcleos (Joubert e Tobin, 1989), ao passo que a castração de animais reduz a proliferação das células satélites (Mulvaney e cols., 1988). Esses resultados também são observados em humanos, pois biópsias de atletas usuários de esteróides anabolizantes apresentam maior número de núcleos em miofibras e cinco vezes mais miofibras com núcleos centralizados em comparação a não-usuários. Devido ao fato de o núcleo no interior da miofibra ser pós-mitótica, novos mionúcleos são originários das células satélites (Sinha-Hikim e cols., 2003).

#### **2.7.4.3 Glicocorticóides**

Os GC pertencem a uma classe de hormônios sintetizados pelo córtex adrenal, sendo secretados na corrente sanguínea. Em humanos, a ocorrência natural dos GC é o cortisol, enquanto que nos ratos é denominado de corticosterona, sendo ambos produzidos a partir do seu precursor, a cortisona (Frey e cols., 2004).

A ação dos GC é mediada por um receptor protéico, localizado no citoplasma celular, denominado de receptor de GC. Uma vez formado o complexo hormônio-receptor, há a translocação desse complexo para o núcleo, ativando a transcrição gênica. Por outro lado, quando não ligado ao hormônio, o receptor se encontra inativo e associado a um complexo multiprotéico que consiste de uma molécula do receptor, duas moléculas da proteína de choque térmico (HSP) 90, uma molécula de HSP70, uma de HSP56, HSP40, p23 e p60 (Pratt, 1993). Esse complexo possui como finalidade a estabilização da estrutura do receptor e facilitação da ligação do hormônio ao receptor de GC que, uma vez ligados, o receptor de GC é dissociado do complexo, seguido de alterações na sua conformação (dimerização) (Castro, 2005).

A atuação do GC se dá a partir da transativação gênica em decorrência da interação direta de dímeros do receptor de GC com uma sequência palindrômica

específica no DNA, chamada elemento responsivo aos GC, presente geralmente na região promotora dos genes. A ligação do dímero de receptores de GC diretamente aos elementos responsivos aos GC estimula a transcrição dos genes responsivos aos GC, com envolvimento de componentes básicos da maquinaria de transcrição gênica (Glass e Rosenfeld, 2000).

Dentre as ações dos GC endógenos ou sintéticos, os quais possuem mecanismos de ação muito semelhantes, cabe destacar sua propriedade proteolítica na musculatura esquelética, principalmente pela ativação do sistema ubiquitina proteassoma. O processo de degradação protéica, resultando em atrofia da musculatura, é associado principalmente a dois genes: *MAFbx* (também chamada *atrogen-1*) e *MuRF1* (*muscle RING finger protein 1*) (Bodine e cols., 2001b), com ambos codificando as E3 ubiquitina ligases, que mediam a ubiquitinação (marcação) de substratos protéicos distintos, para então sofrerem degradação pelo proteassoma (Petroski e Deshaies, 2005).

Além disso, os GC têm a capacidade de interagir com outros hormônios, favorecendo a diminuição da síntese protéica e, como consequência, a degradação protéica. Dentre eles, destaca-se a diminuição da expressão de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para síntese de IGF-1 e sua via de sinalização (Cho e cols., 2010) e testosterona (Inder e cols., 2010), implicando em queda do sinal anabólico, e aumentando a expressão de miostatina (Ma e cols., 2003), que é um fator supressor da síntese protéica e será discutido adiante. Além disso, a partir da modulação desses fatores envolvidos na regeneração muscular, os GC também podem prejudicar a ativação, proliferação e diferenciação das células satélites que, em soma, tanto a capacidade inicial (células satélites), quanto tardia (sinal anabólico) podem ser negativamente afetadas pelos GC.



#### 2.7.4.4 Miostatina

Os fatores transformadores de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) são importantes citocinas envolvidas na regulação do crescimento celular, desempenhando suas ações a partir da ligação com um par de receptores localizados na membrana celular e consequente ativação da fosforilação de proteínas Smad, as quais são translocadas para o núcleo para atuação sobre genes-alvo (Chen e cols., 2002). Os membros da família TGF- $\beta$  são reconhecidos há tempos como moduladores da atividade dos mioblastos, inibindo tanto a proliferação quanto diferenciação celular (Lefaucheur e cols., 1996). As funções que os TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 desempenham na regeneração muscular são complexas, modulando tanto a fusão do mioblasto, regulação da resposta imunológica e sobrevivência do neurônio motor (McLennan e Koishi, 2002).

Nesse sentido, a miostatina, ou fator de crescimento e diferenciação-8 (GDF-8), foi elencada como membro dos TGF- $\beta$  há pouco tempo, com atividade inibidora da síntese protéica (McPherron e cols., 1997), pois a deleção do gene da miostatina em camundongos é capaz de promover um aumento marcante da massa muscular, estimulando a hipertrofia e/ou hiperplasia da miofibra (Grobet e cols., 2003; McPherron e cols., 1997). Por outro lado, camundongos transgênicos que apresentam expressão elevada de miostatina em um músculo específico apresentam atrofia muscular (Reisz-Porszasz e cols., 2003).

A ação da miostatina é desempenhada a partir da sua ligação com receptores de membrana activina tipo II, particularmente Act RIIIB (Lee e McPherron, 2001). Estudos *in vitro* envolvendo mioblastos C2C12 demonstraram que, em altos níveis, a miostatina é capaz de inibir a proliferação e afetar a diferenciação. Além disso, em experimentos realizados com roedores submetidos a suspensão de membros, é possível observar supressão da proliferação das células satélites e aumento dos níveis de miostatina (Carlson e cols., 1999). Assim, atribui-se à miostatina que seus efeitos negativos na massa muscular são ocasionados a partir da inibição da proliferação das células satélites (Chargé e Rudnicki, 2004).

A expressão de miostatina parece ser muito bem regulada durante as diferentes etapas da regeneração muscular, pois, de acordo com Kirk e cols. (2000), altos níveis são encontrados durante o período de necrose das miofibras e do tecido conjuntivo, momento em que a degeneração é alta e a ativação das células satélites é baixa. Além disso, a miostatina nesse período também pode atuar como quimioatrativa para macrófagos e células inflamatórias. Em contrapartida, no período em que as células satélites se tornam ativadas, os níveis de miostatina nas células mononucleadas localizadas na região do local em processo de regeneração e nos miotubos regenerados são baixos (Chargé e Rudnicki, 2004).

### 3 JUSTIFICATIVA

Os benefícios do sono para a saúde dos seres vivos estão se tornando cada vez mais evidentes na literatura científica. Entretanto, o envolvimento do sono no metabolismo muscular é algo ainda pouco explorado, mesmo sendo de conhecimento geral que o sono é fundamental para a recuperação física e muscular.

Tanto em humanos quanto animais, o débito de sono está associado com alterações fisiológicas que permitem traçar uma associação promissora no estudo do metabolismo muscular. Dentre tais alterações, destaca-se o aumento da secreção de hormônios catabólicos e diminuição de hormônios com perfil anabólico, criando assim um ambiente favorecedor da degradação protéica.

Portanto, levando em consideração que a utilização de modelos de privação de sono em ratos Wistar é de fundamental relevância, se torna pertinente avaliar o impacto que a privação de sono, especificamente da fase paradoxal, pode promover na estrutura de músculos saudáveis ou submetidos à lesão.

## 4 OBJETIVOS

### Objetivo geral

Verificar os efeitos da PSP, e do rebote de sono, nas respostas hormonais e na histomorfometria do músculo *tibialis anterior* (TA), submetido ou não à criolesão, de ratos Wistar.

### Objetivos específicos

- Avaliar a massa do músculo TA, submetido ou não à criolesão, após a PSP e rebote de sono.
- Avaliar a área de secção transversa (AST) das fibras do músculo TA, submetido ou não à criolesão, após a PSP e rebote de sono.
- Avaliar as concentrações séricas de testosterona após a PSP e rebote de sono.
- Avaliar as concentrações plasmáticas de corticosterona após a PSP e rebote de sono.

## 5 MATERIAL E MÉTODO

Previamente, essa pesquisa foi submetida, avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, sob protocolo #0764/10.

### 5.1 Animais experimentais e condições ambientais

Foram utilizados durante o estudo ratos albinos (*Rattus norvegicus*), machos, da linhagem Wistar, com aproximadamente 3 meses de idade. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Psicobiologia e provenientes da colônia do CEDEME da UNIFESP/EPM. Os animais foram mantidos até o início do experimento, sob as seguintes condições: ciclo claro/escuro 12:12h, cuja iluminação inicia-se as 7h, em uma sala climatizada com a temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), com água e ração fornecidas *ad libitum*.

Durante a fase de desenvolvimento, os animais permaneceram em grupos de 4-6 animais, em caixas de polipropileno brancas (31x38x16,5cm) e tampas de aço inox com recuos para o fornecimento de água e ração. Para a formação das caixas moradias, foram utilizados maravalha de pinus, trocada 6 vezes por semana, no período da manhã, pelos técnicos do laboratório.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos por pessoal treinado, estando de acordo com o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals - National Research Council*, 1996).

## **5.2 Protocolos experimentais**

Para se atingir o objetivo proposto e compreender os efeitos da PSP na recuperação muscular, foram realizados dois protocolos experimentais, os quais serão descritos adiante.

### **5.2.1 Experimento 1**

Este experimento foi elaborado inicialmente para avaliar os efeitos da PSP na massa e na AST das fibras do músculo TA. Todos os procedimentos utilizados serão descritos logo abaixo:

#### **5.2.1.1 Amostra e métodos**

Foram utilizados 9 a 10 animais por grupo, com 3 meses de idade e 300 a 350 g de massa corporal, distribuídos em 2 grupos experimentais, um representado por animais controles (Grupo CTRL) e outro por animais submetidos à PSP por 96 horas contínuas (Grupo PSP).

A massa corporal foi mensurada no início e término da privação, sendo a variação da massa corporal (delta da variação da massa corporal) calculada subtraindo-se a massa corporal antes da privação da massa corporal após o término da mesma (delta = massa corporal final - massa corporal inicial).

Após o término da privação e pesagem final, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue, para subsequente análise das concentrações de testosterona e corticosterona, e do músculo TA, para avaliação da massa muscular e AST das fibras.

## 5.2.2 Experimento 2

Este experimento foi elaborado para avaliar os efeitos da PSP na massa e na AST do músculo TA previamente submetido à criolesão, assim como nas concentrações de testosterona e corticosterona. Todos os procedimentos utilizados serão descritos logo abaixo:

### 5.2.2.1 Amostra e métodos

Foram utilizados 8 a 9 animais por grupo, com 3 meses de idade e 330 a 380 g de massa corporal, distribuídos em 4 grupos experimentais. O primeiro foi representado por animais submetidos à criolesão e que tiveram período de sono *ad libitum* por 96 horas (Grupo D-CTRL); o segundo por animais submetidos ao procedimento de criolesão e posteriormente à PSP por 96 horas (Grupo D-PSP); o terceiro submetido ao procedimento de criolesão, seguido de PSP por 96 horas e, após o término da privação, foi permitido que os animais retornassem às suas casas-moradia para que dormissem livremente pelas 96 horas subsequentes (Grupo D-RB); e o quarto grupo, em que os animais foram submetidos ao procedimento de criolesão e tiveram período de sono *ad libitum* por 192 horas, para equivaler o período do grupo D-RB96 (Grupo D-CTRL-RB).

A massa corporal foi mensurada no início e término da privação, sendo a variação da massa corporal (delta da variação da massa corporal) calculada subtraindo-se a massa corporal antes da privação da massa corporal após o término da mesma (delta = massa corporal final - massa corporal inicial).

Após o término da privação e pesagem final, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue, para subsequente análise das concentrações de testosterona e corticosterona, e do músculo TA, para avaliação da massa muscular e AST das fibras da região danificada.

### 5.3 Procedimentos experimentais

#### 5.3.1 Protocolo de criolesão

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados após os animais serem anestesiados com injeção intraperitoneal de anestésico geral a base de Ketamina (Dopalen®) e Xilazina (Anasedan®). Para aplicação da anestesia, foram utilizadas seringas da marca BD 100 Unidades, com Agulha BD Ultra-Fine®, modelo insulina, de comprimento: 12,7 mm, calibre: 0,33 mm e bisel trifacetado. Cada animal foi anestesiado utilizando-se mistura de ketamina (0,1 ml/100 gramas do animal) e de xylazina (0,1 ml/100 gramas do animal).

O modelo de criolesão utilizado foi adaptado do protocolo descrito por Miyabara e cols. (2006). A pele que recobre o músculo TA da pata esquerda foi tricotomizada, limpa e seguida de uma incisão transversal e afastamento da fáscia que recobre o músculo. A criolesão do músculo TA foi realizada por meio de duas aplicações, com intervalo de tempo de 30 segundos entre elas (duração de 10 segundos cada), utilizando bastão metálico de extremidade plana (bastão de ferro com 4mm de largura e 10mm de comprimento), previamente resfriado em nitrogênio líquido, diretamente no ventre da musculatura. Após o procedimento foi realizada a sutura das áreas incisadas, utilizando-se fio de poliamida (6,0) e os animais sendo mantidos em gaiolas com aquecimento para prevenir a hipotermia e, visando o bem estar dos mesmos, foram administrados medicamentos analgésicos diluídos em água para alívio de dor. O músculo TA da pata contralateral serviu como controle (pata direita), pois o procedimento cirúrgico não promove lesão à musculatura. Na fig. 1 está demonstrado um músculo TA danificado (TAD) e um sadio (TAS).





**Fig. 1** – Demonstração do músculo *tibialis anterior* danificado (esquerda) e sadio (direita).

### **5.3.2 Protocolo de privação de sono paradoxal**

Antes do procedimento de privação propriamente dito, os animais foram adaptados ao tanque de privação por 3 dias seguidos, por 60 minutos a cada dia, para minimização do estresse sofrido pelos mesmos (Martins e cols., 2010). Cabe destacar que essa etapa aconteceu antes do protocolo de criolesão, para manipular os animais o menos possível após a cirurgia.

A PSP foi realizada pelo método da plataforma múltipla modificada (Suchecki e Tufik, 2000) e se iniciou 3 dias após o protocolo de criolesão, na intenção de permitir que os animais se recuperassem parcialmente e assim fosse diminuído o risco de infecções decorrentes do ambiente úmido destinado à PSP. O protocolo de privação consiste em alojar até dez animais sobre 14 plataformas circulares e estreitas

de 6,5cm de diâmetro espaçadas por cerca de 10 cm umas das outras, submersas em água em um tanque de aço inox (123 cm de comprimento x 44 cm de largura x 44 cm de altura). O nível da água fica a um centímetro abaixo da superfície da plataforma, e os animais são obrigados a permanecer nas plataformas; ao iniciar o sono paradoxal, podem cair na água, devido à atonia muscular que acompanha essa fase do sono, sendo então acordados (Fig. 2).

O período de 96 horas de sono disponibilizado aos grupos D-CTRL, D-CTRL-RB e D-RB, foi realizado nas caixas de polipropileno que foram mantidas no mesmo local onde foi realizada a privação, com tempo equivalente ao período de privação utilizado.



**Fig. 2** – Aparato utilizado para realização da privação de sono paradoxal.

### 5.3.3 Procedimentos para eutanásia

Após o período de PSP ou de sono, todos os animais foram levados para uma sala contígua, de forma seriada, onde sofreram eutanásia pelo método de decapitação (Andersen e cols., 2005).

### 5.3.4 Dosagens sanguíneas

Após a eutanásia, o sangue foi coletado em tubos de vidro e centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma ou soro, sendo então armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até que as análises fossem realizadas. Os níveis séricos de testosterona (coeficiente de variação = 7,7%) foram mensurados a partir de ensaio imuno-enzimático por quimioluminescência (Advia Centaur, Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA), enquanto que os níveis plasmáticos de corticosterona (coeficiente de variação = 7,1%) foram obtidos a partir do kit comercial para dosagem do hormônio pela técnica de radioensaio específico para ratos (MP Biomedicals, USA).

### 5.3.5 Processamento dos tecidos e análise histomorfométrica

Após a eutanásia dos animais, os músculos TA de ambas as patas foram cuidadosamente dissecados, limpos e pesados, sendo então divididos em dois fragmentos para obtenção da porção distal. Esses fragmentos foram posicionados envoltos por massa composta de leite em pó e *Tissue Tek*, resfriados imediatamente em isopentano por 20 segundos e congelados em nitrogênio líquido, permanecendo em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até que as análises fossem realizadas.

Cortes seriados de 10  $\mu\text{m}$  foram obtidos em criostato, à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , coletados em lâminas de vidro silanizadas, submergidos em acetona e secos à temperatura ambiente por 10 minutos em cada etapa. Para análise morfológica foi utilizada coloração com Hematoxilina e Eosina (HE).

Fotografias digitais foram tiradas de 3 a 4 músculos (Miyabara e cols., 2006) de cada grupo com auxílio de um microscópio de campo claro Olympus BX50 uma câmera DP71 (Melville, NY) com objetiva de 40x.

A análise das AST foi realizada de forma cega a partir da contagem de 200 fibras por músculo TAS (Gilson e cols., 2007) e 2000 fibras por músculo TAD (Miyabara e cols., 2006) que, para este caso, a contagem foi realizada somente na área previamente danificada (Software Axio Vision 4.6, Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

### **5.3.6 Análise estatística**

Os dados foram analisados com auxílio do Software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). No experimento 1, a comparação entre os grupos PSP e CTRL foi realizada a partir do teste T de *Student* para amostras independentes, enquanto que para o Experimento 2, aplicou-se o teste *one way* ANOVA para comparação das variáveis entre os grupos, seguido do teste *post-hoc* de Duncan. Todos os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão e a significância estatística adotada foi de  $p \leq 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Experimento 1

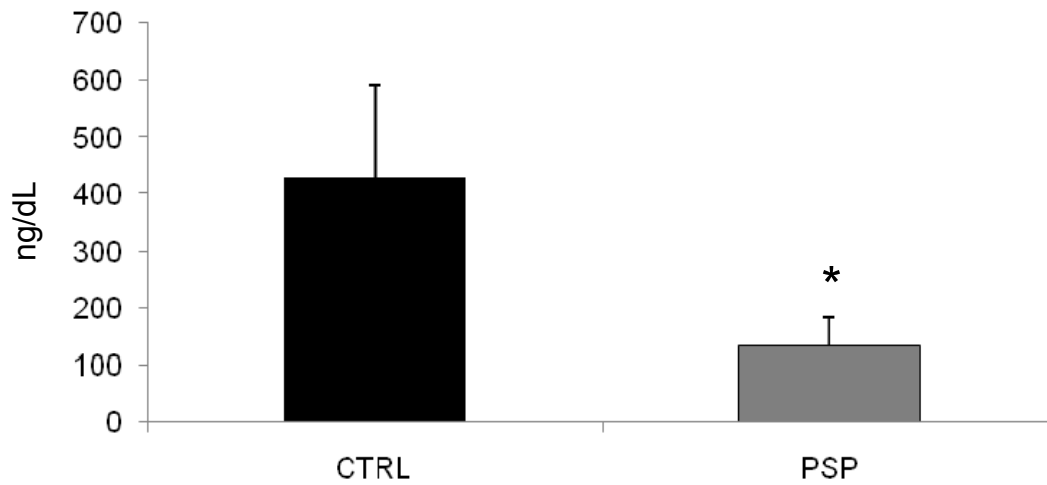
No início do experimento 1, não houve diferenças significantes entre os grupos quando analisada a massa corporal dos animais ( $t = - 0,75$ ,  $gl = 17$ ,  $p = 0,46$ ). Entretanto, a PSP resultou em reduções da massa corporal no grupo PSP, representada pelo delta da variação ( $t = 12,62$ ,  $gl = 17$ ,  $p < 0,01$ ), na massa do músculo TA ( $t = - 5,79$ ,  $gl = 17$ ,  $p < 0,01$ ) e na AST das fibras musculares ( $t = - 4,1$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0,01$ ), assim como demonstradas na tab. 1.

**Tab. 1** – Massa corporal, massa muscular e área de secção transversa das fibras do músculo *tibialis anterior*.

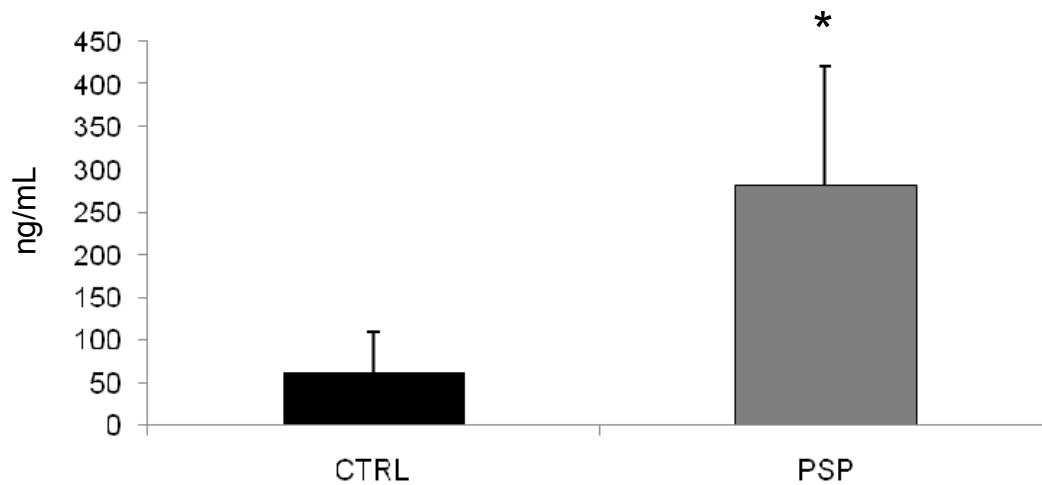
Variáveis	CTRL	PSP-	P*
Massa corporal inicial (g)	344,6 ± 19,2	350,6 ± 14,8	0,46
Delta de variação da massa corporal (g)	6,3 ± 5,4	-27,0 ± 6,1	< 0,01
<i>Tibialis anterior</i> (mg)	0,67 ± 0,05	0,56 ± 0,03	< 0,01
Área de secção transversa ( $\mu\text{m}^2$ )	2784,9 ± 225,6	1924,3 ± 284,3	0,01

\* Comparação realizada a partir do teste T de *Student* para amostras independentes.

Na fig. 3 e fig. 4 estão dispostas as concentrações de testosterona e corticosterona, respectivamente, observando-se redução de testosterona ( $t = 5,25$ ,  $gl = 17$ ,  $p < 0,01$ ) e aumento de corticosterona ( $t = - 4,65$ ,  $gl = 17$ ,  $p < 0,01$ ) no grupo PSP.

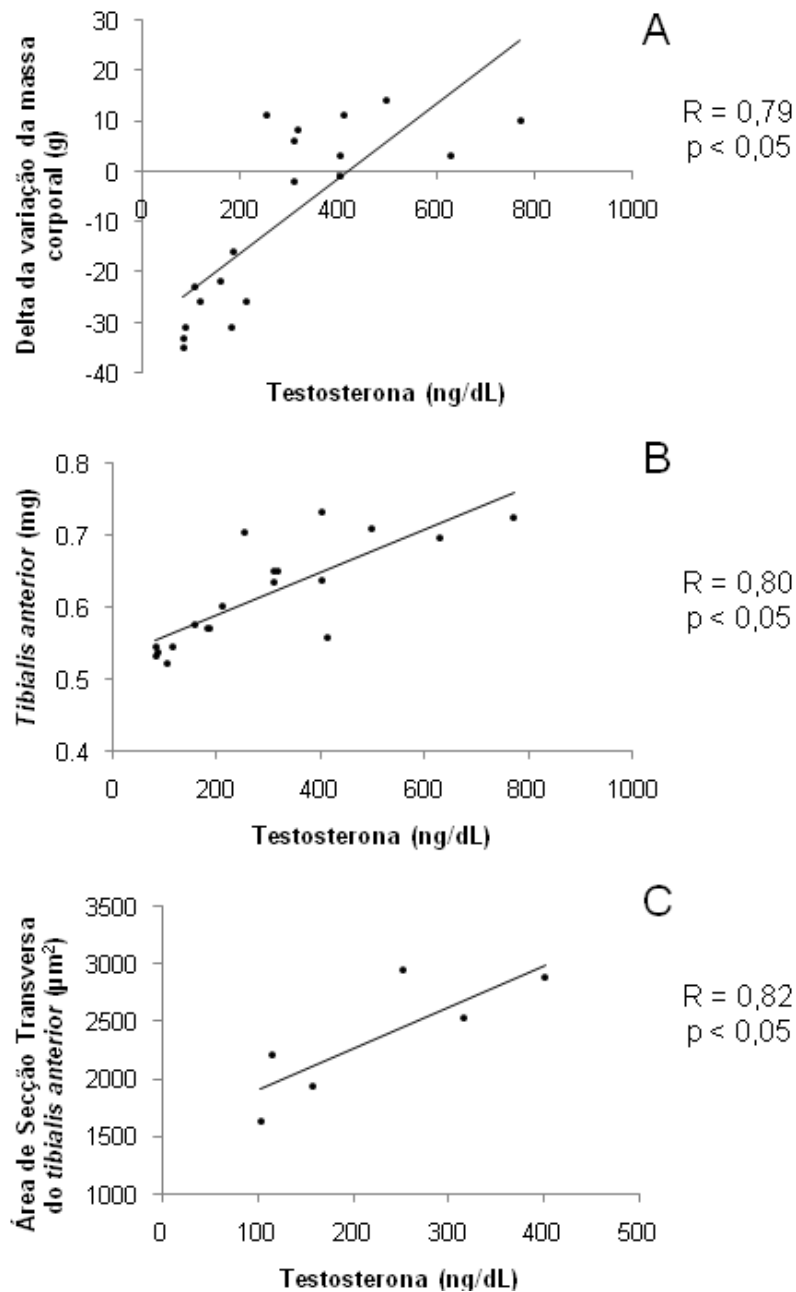


**Fig. 3** – Concentrações de testosterona. Análise realizada a partir do teste T de *Student* para amostras independentes. \*  $p < 0,01$ .



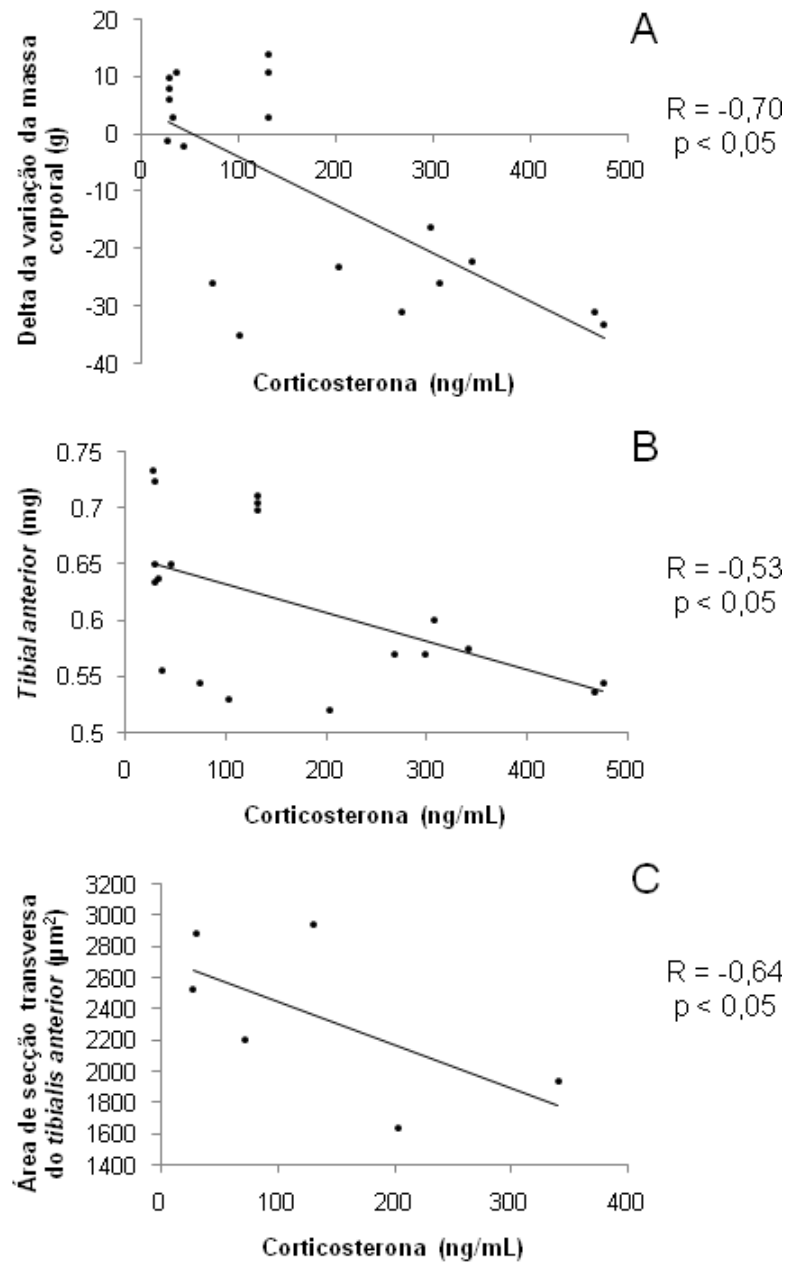
**Fig. 4** – Concentrações de corticosterona. Análise realizada a partir do teste T de *Student* para amostras independentes. \*  $p < 0,01$ .

Na fig. 5 são apresentados os dados de correlação entre testosterona e delta da variação da massa corporal (A), massa do TA (B) e AST das fibras do TA (C), sendo possível observar correlações positivas para os três parâmetros ( $R = 0,79$ ,  $R = 0,80$  e  $R = 0,82$ , respectivamente,  $p < 0,05$ ).



**Fig. 5** – Correlações entre **(A)** Delta da variação da massa corporal (g) e testosterona (ng/dL); **(B)** Massa do *tibialis anterior* (mg) e testosterona (ng/dL); e **(C)** Área de secção transversa das fibras do *tibialis anterior* ( $\mu\text{m}^2$ ) e testosterona (ng/dL).

Na fig. 6 são apresentados os dados de correlação entre corticosterona e delta da variação da massa corporal (A), massa do TA (B) e AST das fibras do TA (C), sendo possível observar correlações negativas para os três parâmetros ( $R = -0,70$ ,  $R = -0,53$  e  $R = -0,64$ , respectivamente,  $p < 0,05$ ).



**Fig. 6** – Correlações entre **(A)** Delta da variação da massa corporal (g) e corticosterona (ng/mL); **(B)** Massa do *tibialis anterior* (mg) e corticosterona (ng/mL); e **(C)** Área de secção transversa das fibras do *tibialis anterior* ( $\mu\text{m}^2$ ) e corticosterona (ng/mL).



## 6.2 Experimento 2

Uma vez constatada a atrofia do músculo TA no experimento 1, o experimento 2 foi conduzido de forma a se manter os mesmos procedimentos, mas com a realização prévia da criolesão para os 4 grupos experimentais. Sendo assim, na tab. 2 estão descritas as variáveis de massa corporal inicial, delta da variação da massa corporal e a massa dos músculos TAS e TAD. Assim como no Experimento 1, não houve diferenças significantes na massa corporal no início do protocolo experimental entre os grupos [F (3,30) = 0,46, p = 0,71]. Entretanto, os dois grupos submetidos à PSP (D-PSP e D-RB) apresentaram delta da variação da massa corporal significativamente menor que os grupos D-CTRL e D-CTRL-RB [F(3,30) = 98,1, p < 0,01].

**Tab. 2** – Massa corporal e massa dos músculos *tibialis anterior* sadio e danificado.

Variáveis	D-CTRL	D-PSP	D-CTRL-RB	D-RB
Massa corporal inicial (g)	344,1 ± 28,9	335,9 ± 19,5	347, 0 ± 33,0	350,9 ± 24,9
Delta de variação da MC (g)	10,8 ± 4,5	- 34,9 ± 9,7 *† ‡	16,2 ± 8,3	- 25,11 ± 6,4 *†
<i>Tibialis anterior</i> sadio (mg)	0,65 ± 0,07	0,53 ± 0,05 *†	0,66 ± 0,08	0,59 ± 0,06 *†
<i>Tibialis anterior</i> danificado (mg)	0,62 ± 0,07	0,51 ± 0,05 *†	0,62 ± 0,06	0,57 ± 0,05

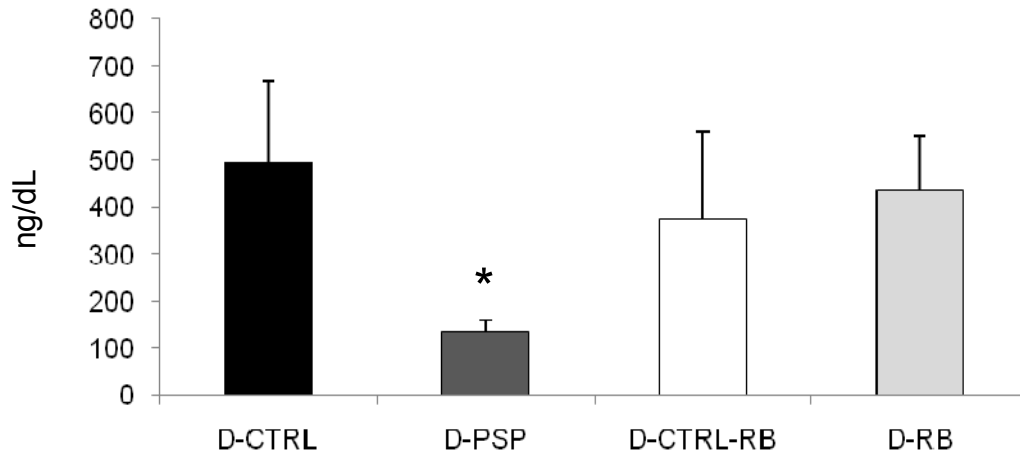
Os dados apresentados foram comparados a partir do teste *One Way* ANOVA, seguido do *post-hoc* de Duncan. **Abreviatura:** MC, massa corporal.

\* Diferença significativa em relação ao grupo D-CTRL, p < 0,01.

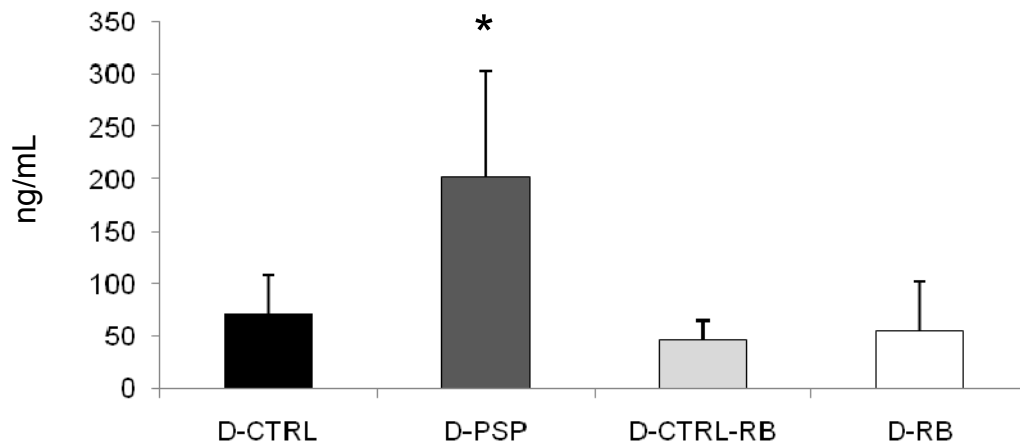
† Diferença significativa em relação ao grupo D-CTRL-RB, p < 0,01.

‡ Diferença significativa em relação ao grupo D-RB, p < 0,01.

Na fig. 7 e fig. 8 estão dispostas as concentrações de testosterona e corticosterona, respectivamente, observando-se redução de testosterona [F(3,30) = 10,4, p < 0,01) e aumento de corticosterona [F(3,30) = 12,0, p < 0,01) no grupo PSP.

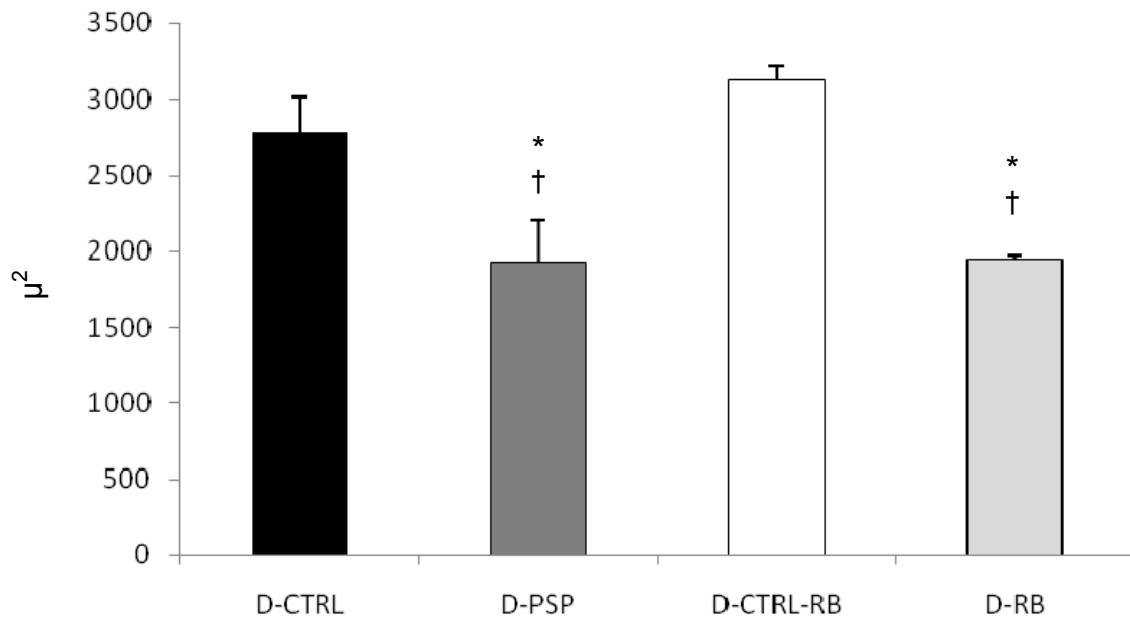


**Fig. 7** – Concentrações de testosterona. Os dados apresentados foram comparados a partir do teste *One Way ANOVA*, seguido do *post-hoc* de Duncan. \* Diferença significativa em relação aos grupos D-CTRL, D-CTRL-RB e D-RB,  $p < 0,01$ .



**Fig. 8** – Concentrações de corticosterona. Os dados apresentados foram comparados a partir do teste *One Way ANOVA*, seguido do *post-hoc* de Duncan. \* Diferença significativa em relação aos grupos D-CTRL, D-CTRL-RB e D-RB,  $p < 0,01$ .

Quando analisado o músculo TAS, o mesmo apresentou massa (Tab. 2) e AST de suas fibras (Fig. 9) significativamente menores nos grupos D-PSP e D-RB em relação aos grupos D-CTRL e D-CTRL-RB [ $F(3,28) = 6,7$ ,  $p < 0,01$  para massa muscular e  $F(3,8) = 30,98$ ,  $p < 0,01$  para AST].

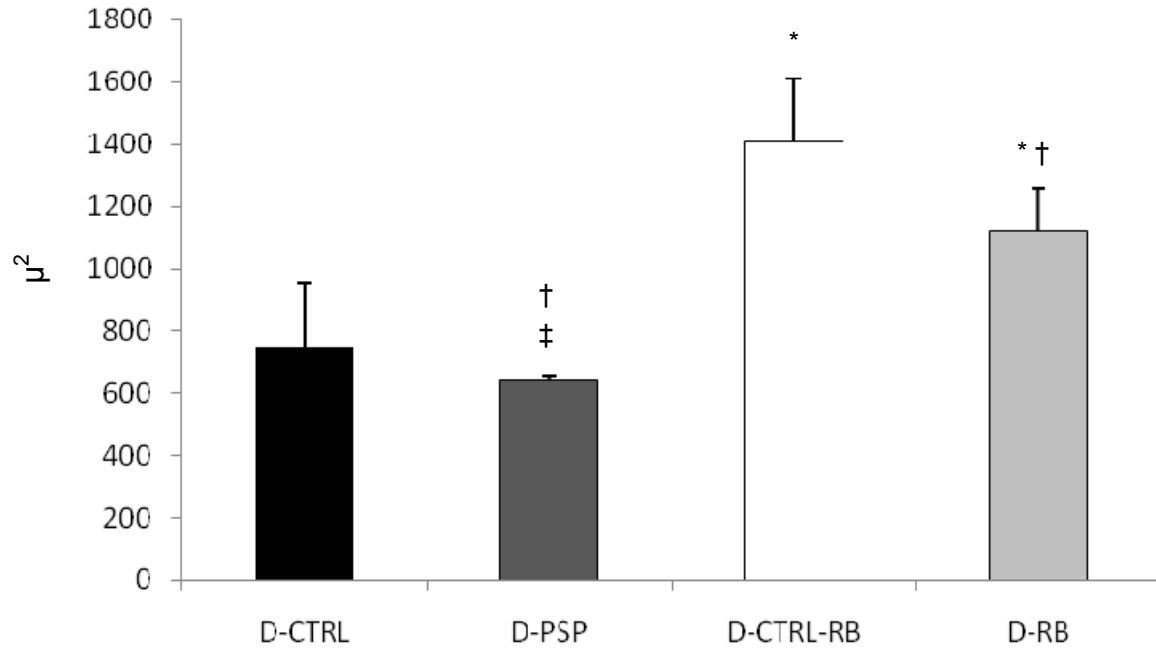


**Fig. 9** – Área de secção transversa do músculo *tibialis anterior* sadio.

\* Diferença significativa em relação ao grupo D-CTRL,  $p < 0,01$ .

† Diferença significativa em relação ao grupo D-CTRL-RB,  $p < 0,01$ .

Com relação ao músculo TAD, somente o grupo D-PSP apresentou menor massa em relação aos grupos D-CTRL e D-CTRL-RB [ $F(3,29) = 5,49$ ,  $p < 0,01$ ] (Tab. 2). A AST das fibras do músculo TAD do grupo D-PSP não apresentou diferença significativa em relação ao grupo D-CTRL ( $p = 0,42$ ), mas foi menor que os grupos D-CTRL-RB e D-RB ( $p < 0,01$ ). Além disso, o grupo D-RB apresentou AST significativamente menor em relação ao grupo D-CTRL-RB [ $F(3,8) = 14,5$ ,  $p < 0,01$ ] (Fig. 10). A figura 11 demonstra os cortes transversais dos músculos TAS e TAD de todos os grupos do experimento 2, sendo possível observar a ASTs das fibras nos diferentes períodos.

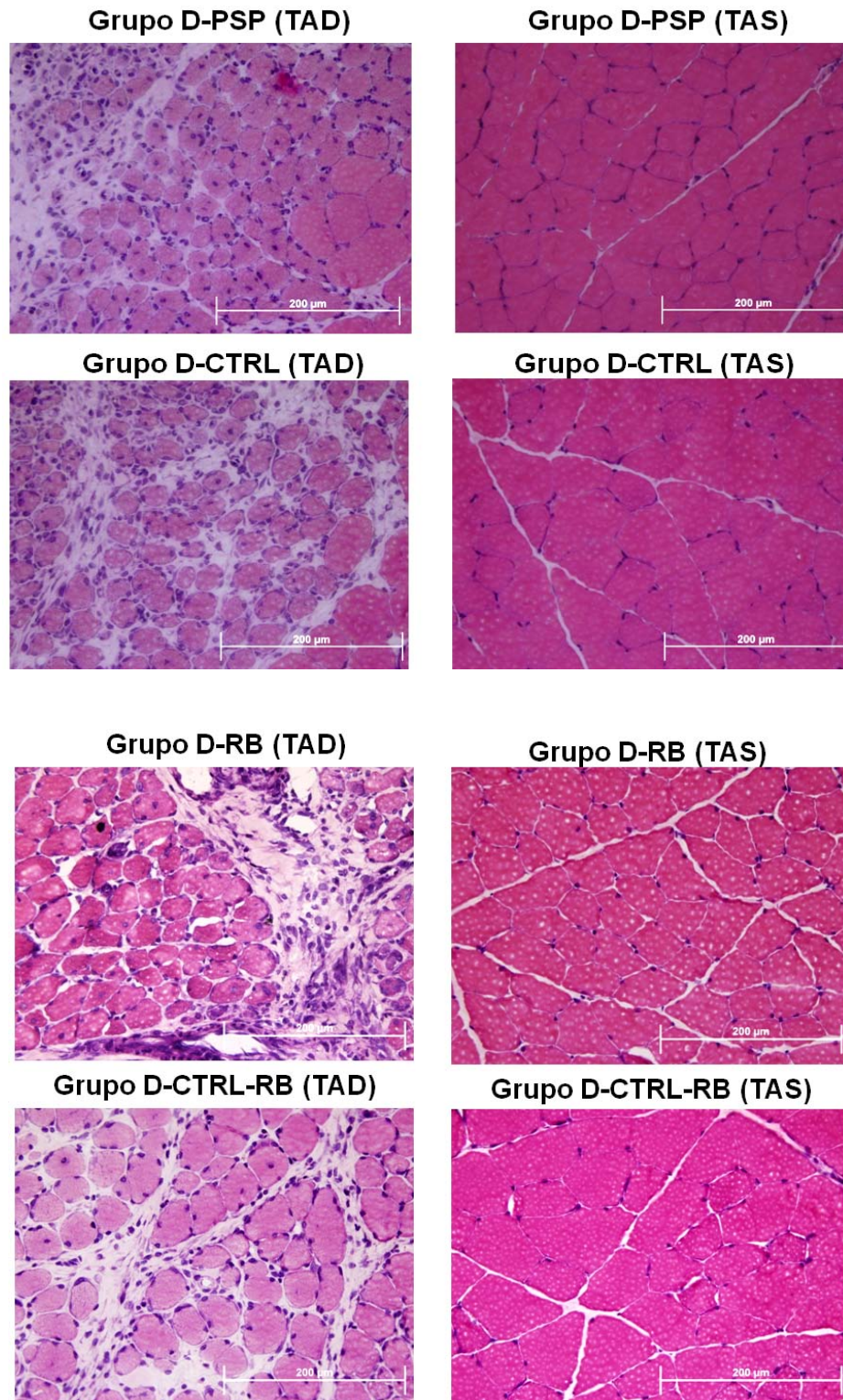


**Fig. 10** – Área de secção transversa do músculo *tibialis anterior* danificado.

\* Diferença significativa em relação ao grupo D-CTRL,  $p < 0,05$ .

† Diferença significativa em relação ao grupo D-CTRL-RB,  $p < 0,05$ .

‡ Diferença significativa em relação ao grupo D-RB,  $p < 0,05$ .



**Fig. 11** – Cortes transversais dos músculos *tibialis anterior* sadio e danificado. HE, 40x.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Privação de sono paradoxal e atrofia muscular: Caracterização das hipóteses

Os principais achados do presente estudo foram que a redução da massa corporal em decorrência da PSP, que é um fenômeno muito bem estabelecido na literatura, não está somente associada com diminuição da massa de tecido adiposo (Hipólide e cols., 2006), mas também de massa muscular. Sendo assim, é possível postular que as alterações hormonais impostas pela PSP possam, em partes, criar um ambiente potencialmente catabólico à musculatura esquelética.

Para compreensão das funções do sono, assim como dos prejuízos à saúde em decorrência de sua falta, os modelos animais são estratégia de merecido destaque. No trabalho realizado por Hipólide e cols. (2006), envolvendo a PSP por 96 horas, verificou-se que mesmo em curto prazo o balanço energético negativo se tornou evidente, resultando em perda de massa corporal. De acordo com os autores, esse balanço negativo é refletido pela redução de massa corporal devido a um aumento de aproximadamente 50% do gasto energético, independente de alteração no volume de ração consumida. Cabe mencionar também que, embora a PSP induza a atividade de roer nos animais, (32,9% para animais privados e 17,8% para animais controle), ratos privados consomem mais alimentos do que ratos não-privados.

Considerando que a estimulação da atividade simpática e da função adrenal também favorece à maior secreção de corticosterona, este hormônio se torna elevado em apenas 24 horas de PSP (Andersen e cols., 2005), permanecendo assim por até 96 horas de realização do protocolo (Martins e cols., 2010; Andersen e cols., 2005; Suchecki e cols., 2002). A resposta aumentada e imediata de corticosterona em situações de estresse (dentre as quais se enquadra a PSP) tem como objetivo a rápida mobilização de substratos energéticos. A integração das ações da corticosterona com as ações das catecolaminas e glucagon favorece a indução da glicogenólise, gliconeogênese, lipólise e, em casos mais severos, proteólise (Sapolsky e cols., 2000).

A ação lipolítica da corticosterona no tecido adiposo subcutâneo é muito marcante, sustentando ainda mais os efeitos observados na massa corporal por nós e por outros autores (Hipólide e cols., 2006; Martins e cols., 2010). Além disso, cabe destacar que a composição corporal também se torna fortemente influenciada, podendo ocorrer redução de cerca de 37% do conteúdo de gordura corporal (Hipólide e cols., 2006).

Levando em consideração todos esses dados, seria pertinente supor que, além da redução de gordura corporal, ocorreria diminuição da quantidade de proteínas na carcaça. Entretanto, esse dado não foi observado no trabalho realizado por Hipólide e cols. (2006), os quais verificaram aumento do conteúdo absoluto de proteínas, postulando que a proteólise pode não se tornar evidente durante o período de 96 horas de PSP. Embora de forma especulativa, a possibilidade apontada foi que, como os animais são impedidos de entrar no sono paradoxal a partir da técnica de privação, os mesmos também eram impossibilitados de apresentar a atonia muscular característica dessa fase do sono. Por fim, a manutenção do tônus muscular aumentado por período prolongado poderia ter contribuído para aumento da quantidade de proteínas na carcaça.

Cabe ressaltar que tal achado é difícil de ser compreendido frente a uma condição em que a sinalização catabólica é predominante. Além disso, a condição de PSP também está representada por diminuição de hormônios anabólicos, como testosterona (Andersen e cols., 2005), GH e IGF-1 (Everson e Crowley, 2004), o que poderia favorecer ainda mais a degradação protéica. O racional postulado por nós é que a PSP, além de instituir reduções da massa corporal e de gordura corporal, também repercutiria em diminuição da quantidade de proteínas, mas especificamente na musculatura esquelética.

Dentre os hormônios com atividade proteolítica que se tornam aumentados durante a PSP, cabe destacar o glucagon e corticosterona (Martins e cols., 2010). O primeiro apresenta capacidade de degradar proteínas no fígado para fornecimento de aminoácidos para a gliconeogênese (Martins e cols., 2010), enquanto

que a corticosterona é capaz de induzir proteólise na musculatura esquelética, principalmente de proteínas contráteis (Menconi e cols., 2008). Partindo do princípio de que a massa muscular é mantida pelo balanço entre a estimulação da síntese e degradação protéica, a condição hormonal induzida pela corticosterona se tornaria forte indutora da degradação protéica muscular. Até o momento, nenhum trabalho evidenciando estes efeitos está disponível na literatura, mas nosso grupo postulou recentemente que a PS poderia prejudicar a fisiologia muscular (Dattilo e cols., 2011). Pelo fato de não existir trabalhos prévios a respeito desses efeitos, podemos, a princípio, considerar que a redução da massa do músculo TA e da AST das fibras do mesmo ocorreu, ao menos em parte, pelo aumento da corticosterona e da redução de testosterona. Além disso, embora não avaliado nesse estudo, cabe destacar que o IGF-1, que é um importante hormônio controlador da massa muscular, também se torna reduzido na PS (Everson e Crowley, 2004).

A secreção aumentada de corticosterona pode contribuir de forma múltipla para a indução da atrofia muscular. O aumento de GC é suficientemente capaz de estimular a degradação protéica muscular e mediar sua atrofia, possivelmente pela perda protéica específica de miosina de cadeia pesada (Chromiak e Vandeburgh, 1992; Clarke e cols., 2007), especialmente em fibras de contração rápida (Falduto e cols., 1990). Assim, o aumento na secreção de corticosterona observado em nosso estudo pode, de fato, estar associado com aumento da expressão das E3 ubiquitina ligases *MAFbx* e *MuRF1* (Bodine e cols., 2001b). Como consequência, ocorreria aumento da ativação do sistema ubiquitina proteassoma, intermediando a perda de massa muscular e diminuição da AST na condição de PSP.

Embora o período de PS realizado por nós tenha sido relativamente curto, os efeitos dos GC na expressão de RNAm das E3 ligases também são agudos, assim como demonstrado em modelos experimentais utilizando administração de dexametasona. No trabalho realizado por Zhao e cols. (2008), o RNAm para *MAFbx* se tornou elevado em 1 dia, permanecendo assim por 7 dias, enquanto que Cho e cols. (2010) encontraram aumento da expressão de RNAm para *MAFbx* em 3 e 7 dias e *MuRF1* em 7 dias. Tais alterações podem, então, ser um dos mecanismos



responsáveis pela redução da massa muscular encontrada em apenas um dia no músculo gastrocnêmio (Zhao e cols., 2008), 4 dias nos músculos TA, gastrocnêmio e sóleus (Gilson e cols., 2007), 7 dias nos músculo gastrocnêmio (Zhao e cols., 2008), *plantaris* e extensor digitorum longus (Nicastro e cols., 2011) e 10 dias nos músculos TA, gastrocnêmio e sóleus (Gilson e cols., 2007). Esses dados sugerem que a ação dos GC é muito rápida (1 dia ou menos) e permanece durante o período de administração do fármaco (10 dias ou mais).

Os GC também têm a capacidade de interagir com a testosterona, pois Gao e cols. (2002) relataram que esses hormônios induzem apoptose das células de Leydig, diminuindo assim a produção de testosterona. Corroborando esses dados, a administração de dexametasona também reduz significativamente os níveis de testosterona sanguíneos e dos receptores de andrógenos na musculatura esquelética (Inder e cols., 2010), diminuindo sua ação nos tecidos. Dessa forma, a soma destes dados justificaria a correlação negativa entre testosterona e corticosterona encontrada no presente estudo. Assim, além dos níveis elevados de corticosterona poderem induzir atrofia muscular, a redução paralela dos níveis de testosterona diminuiria a sinalização da síntese protéica, favorecendo ainda mais a redução de massa muscular.

Esse fenômeno se torna factível a partir da análise de modelos experimentais envolvendo animais idosos e modelos de atrofia muscular induzida pela dexametasona, sendo este último muito importante, já que a dexametasona possui ações similares aos da corticosterona (Menconi e cols., 2008). Primeiramente, ratos idosos, assim como humanos idosos, apresentam níveis de testosterona significativamente menores em relação a ratos ou indivíduos jovens, paralelamente à perda de massa muscular (sarcopenia). Em contrapartida, Kovacheva e cols. (2010) verificaram que, quando administrado testosterona em ratos idosos, há reversão completa da sarcopenia, representada pelo aumento de massa muscular e da AST do músculo gastrocnêmio. Como segunda explicação, o efeito supressor que os GC possuem sobre a testosterona, favorecendo assim a atrofia muscular, parece ser minimizado após a administração concomitante de testosterona, revertendo-se completamente a perda de massa muscular já em 1 dia ou ao longo de 7 dias. Tal

fenótipo pode ser resultado da normalização da expressão de RNAm para a E3 ligase *MAFbx*, que se apresenta aumentada após administração isolada de dexametasona (Zhao e cols., 2008).

Cabe ressaltar que a interação entre corticosterona e testosterona também pode se estender a outros fatores, como a miostatina, a qual é uma potente inibidora da síntese protéica (McPherron e cols., 1997) e capaz de ser inibida pela testosterona (Kovacheva e cols., 2010). Dessa forma, a diminuição de testosterona decorrente da PSP poderia favorecer o aumento da miostatina e sua ação ser desempenhada a partir da inibição da via PI3K-Akt (McFarlane e cols., 2006). Em primeiro plano, a administração de dexametasona em animais com deleção do gene de miostatina não promove atrofia muscular (Gilson e cols., 2007), sugerindo exatamente que esse fator pode ser requerido para promoção da atrofia muscular, destacando ainda mais a integração de diversos hormônios.

Embora não tenha sido dosado por nós nesse estudo, Everson e Crowley (2004) evidenciaram que a PS total por longo período resultou em diminuição das concentrações de IGF-1. Esse fator de crescimento é apontado como um dos principais reguladores do crescimento celular, ativando a via mTOR, a qual modula importantes genes envolvidos no controle do tamanho celular, biogênese ribossomal (p70S6k) e fatores envolvidos na iniciação da tradução protéica (eIF4E) (Shah e cols., 2000). Assim, a diminuição do IGF-1, que pode ser decorrente do aumento da secreção de corticosterona, ou miostatina, diminuiria o sinal de síntese protéica e favoreceria a ativação da proteólise muscular.

## **7.2 Privação de sono paradoxal e regeneração muscular: Caracterização das hipóteses**

Uma vez estabelecido os efeitos da PS no músculo TAS de ratos, evidenciando de fato o sinal atrófico induzido à essa musculatura, fornecemos o

primeiro dado indicando que, de fato, a fisiologia muscular em ratos é prejudicada em decorrência do débito de sono (Dattilo e cols., 2011).

A importância do sono para a recuperação muscular é de conhecimento geral da população, mas esse fenômeno nunca foi demonstrado na literatura. Sendo assim, Dattilo e cols. (2011) associaram pela primeira vez esses dois fatores, postulando que a recuperação muscular poderia ser fortemente prejudicada na ausência ou diminuição do tempo de sono diário. Assim como demonstrado em nossos resultados, embora os mesmos necessitem de exploração mais profunda, a hipertrofia da miofibrila do TAD se tornou prejudicada no grupo D-RB96, indicando prejuízo na sua recuperação.

O protocolo PSP realizado neste estudo foi por curto período de tempo quando comparado com o protocolo de Everson e Crowley (2004), o que nos permitiu verificar somente parte do processo de recuperação da fibra muscular. Para avaliar de maneira mais adequada esse processo, a partir da técnica de lesão utilizada por nós, o protocolo deveria ser estendido até 21 dias para melhor identificação de todos os processos de regeneração (Myabara e cols., 2006, 2005).

De acordo com as etapas de regeneração da musculatura após a indução da lesão, nosso estudo foi capaz de realizar a PSP somente no período teórico final da indução de necrose das miofibrilas e inicial de todas as etapas de ativação, proliferação e diferenciação das células satélites e maturação dos mioblastos. Com os parâmetros analisados por nós, era esperada a ausência de diferenças significantes na AST das miofibrilas entre os animais dos grupos D-PSP e D-CTRL. O sétimo dia após a indução da lesão (72 horas de recuperação + 96 horas de período de sono ou PSP), de acordo com as etapas do processo de regeneração muscular, seria a fase final da proliferação das células satélites, onde o crescimento da miofibrila se tornaria menos evidente. Entretanto, embora não tenham sido realizadas análises adicionais, nossa discussão se torna muito especulativa, mas de forma estruturada para nos permitir o delineamento de novos experimentos e ampliação da linha de pesquisa.

Levando em consideração que a PSP induz aumento muito rápido de corticosterona, o mesmo pode ser um importante gatilho para o desenvolvimento de distúrbios hormonais que permitam, primeiramente, que as etapas iniciais da regeneração muscular se tornem prejudicadas. Levando em consideração que logo em 24 horas há rápida queda de testosterona, com padrão inverso ao da corticosterona (Andersen e cols., 2005), a etapa de sinalização da ativação das células satélites mediada por esse hormônio pode estar diminuída, já que o mesmo desempenha tal papel (Joubert e Tobin, 1995). Além do mais, como alguns estudos demonstram que os efeitos dos GC na musculatura se tornam suprimidos a partir da co-administração de testosterona (ex.: redução da massa muscular e expressão de RNAm para síntese de *MAFbx*), essa associação se torna ainda mais pertinente (Zhao e cols., 2008).

Assim como proposto por Everson e Crowley (2004), a redução dos níveis de IGF-1 em decorrência da PS pode, por sua vez, prejudicar as etapas iniciais da regeneração muscular, diminuindo a capacidade de proliferação e diferenciação das células satélites e fusão dos mioblastos (Vandenburgh e cols., 1991). Ressalta-se também que o período de PSP por 96 horas pode ter acometido exatamente as etapas de proliferação das células satélites e diferenciação celular. Além do mais, o IGF-1 também permite ativação da via PI3K-Akt, sendo a Akt também envolvida na diferenciação miogênica, o que sugere o IGF-1 como regulador da sobrevivência da célula (Lawlor e cols., 2000).

Por outro lado, analisando a capacidade que os GC possuem sobre a sinalização da miostatina, é possível que a mesma se torne positivamente regulada ao longo do período de PSP (Gilson e cols., 2007). Uma vez esse fato estando presente, a maior expressão de miostatina é fator inibidor da proliferação das células satélites, prejudicando assim o início da etapa de regeneração muscular (McPherron e cols., 1997). A relação entre GC e miostatina foi reforçada na literatura a partir dos achados de Gilson e cols. (2007), sugerindo que a deleção do gene de miostatina reverte por completo os efeitos atrofícos mediados pela dexametasona. É fundamental ressaltar que a testosterona é um importante inibidor da expressão da miostatina que, por estar

diminuída na condição de PSP, poderia favorecer a maior expressão de miostatina (Kovacheva e cols., 2010).

Com base nesses princípios e limitação do tempo de PSP utilizando nesta pesquisa, o delineamento do grupo experimental D-RB96 foi estrategicamente realizado. Tal conduta foi tomada não somente para avaliar os efeitos fisiológicos que o sono poderia desempenhar após o período de privação, mas também como seria o comportamento da musculatura após mais 4 dias de recuperação, totalizando assim 11 dias após a indução da lesão. Assim, o grupo D-RB96 apresentou menor AST das fibras do TAD, sugerindo que a PSP prévia prejudicou a hipertrofia das fibras do TAD no 11<sup>o</sup> dia. Então, é possível que a PSP realizada a partir do terceiro dia de indução da lesão tenha prejudicado principalmente todas as etapas da regeneração que envolvem as células satélites, pois mesmo quando normalizado os parâmetros hormonais e, possivelmente, a sinalização anabólica, a miofibrila não se desenvolveu de maneira similar ao grupo D-CTRL.

É prudente ressaltar que, para compreensão dos mecanismos envolvidos na atrofia muscular e prejuízo da sua recuperação após a PS, investigações futuras se tornam necessárias. Além da necessidade de maior exploração dos eventos intracelulares presentes nessa musculatura, o isolamento do fator estresse associado ao método de PSP, para então avaliar o real efeito do sono, é fundamental. Também podemos destacar a possibilidade de elaboração de estratégias farmacológicas e não-farmacológicas para minimização desses efeitos e, dentro do possível, extrapolar tais dados para seres humanos que apresentam débito de sono crônico.

## **8 CONCLUSÃO**

A partir dos dados apresentados, foi possível concluir que PSP por 96 horas induz atrofia do músculo TA, sendo esse fato associado com a diminuição de testosterona e aumento de corticosterona, não existindo recuperação da musculatura após o período de rebote. Além disso, a PSP prejudica a hipertrofia das fibras do músculo TAD, sugerindo que essa condição experimental pode interferir nas etapas de sinalização das células satélites, síntese e degradação protéica.

## Anexo 1

### Carta de aprovação do Comitê de Ética



*Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina*

*Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo*

São Paulo, 30 de Julho de 2010.  
CEP 0764/10

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) MARCO TÚLIO DE MELLO  
Co-Investigadores: Hanna Karen Moreira Antunes, Murilo Dáttilo, Alessandra Medeiros, Marco Tulio de Mello (orientador)  
Disciplina/Departamento: Medicina e Biologia do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

#### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “Efeitos da privação de sono nas vias tróficas e atróficas da musculatura esquelética de ratos”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Verificar os efeitos da privação de sono no balanço das vias de síntese e degradação proteica musculares, nas condições de privação de sono, assim como o impacto da privação de sono no processo de recuperação muscular, após o dano induzido pela criolesão ou toxina de cobra..

RESUMO: Estudo com 1260 ratos Wistar, machos, 12 semanas. Anestésico: ketamina e xilazina. Analgésico: buprenorfina ou butorfanol. Eutanásia: decapitação. Serão realizados 3 sub-projetos: protocolo experimental 1- controle, privação de sono de 48h e 96h, as respectivas condições de rebote de sono de 24h e restrições de 7, 14 e 21 dias, com período de rebote de sono de 7 dias, nas condições sem dano muscular e com dano muscular induzido por criolesão e por toxina de cobra. Protocolo experimental 2 - controle, privação de sono de 48h e 96h, as respectivas condições rebote de sono de 24h e restrições de 7, 14 e 21 dias, com período de rebote de sono de 7 dias, sob administração de L-leucina, nas condições sem dano muscular e com dano muscular induzido por criolesão e por toxina de cobra. Protocolo experimental 3- controle, privação de sono de 48h e 96h, as respectivas condições rebote de sono de 24h e restrições de 7, 14 e 21 dias, com período de rebote de sono de 7 dias, sob administração de morfina, nas condições sem dano muscular e com dano muscular induzido por criolesão e por toxina de cobra. Para cada protocolo experimental, serão utilizados 10 animais por grupo. Os animais serão sacrificados, o sangue coletado para análise de IGF-1, corticosterona, testosterona e TNF-alfa. Serão retirados os músculos das patas traseiras: sóleo, tibial anterior e plantar para análise das proteínas que compõem as vias tróficas e atróficas da musculatura esquelética e para análise histológica. Serão retirados também amostras de tecido hepático e cardíaco. A privação seletiva de sono paradoxal será realizada pelo método da plataforma múltipla. O aminoácido L-leucina será administrado por gavagem 3 dias antes do procedimento de privação do sono e será

mantido pelo tempo que esse procedimento durar. A aplicação da modafinila será realizada ip sempre no período da manhã ao longo de todas as condições de privação e restrição de sono. O procedimento de criolesão será realizado sob anestesia, utilizando-se um bastão metálico resfriado em nitrogênio líquido, diretamente no ventre da musculatura da pata esquerda. Para o protocolo de indução de dano muscular por toxina de cobra, será injetado notexina isolada do veneno de cobra diretamente no ventre do músculo. Para análise histológica do músculo serão realizadas colorações com HE, ATPase e SDH, avaliando-se o remodelamento tecidual, tipo de infiltrado inflamatório, edema necrose, fibras com núcleos centralizados e fibras com nucléolos proeminentes. Serão realizados ensaios de imuno-histoquímica e western blot..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Estudos tem mostrado que o sono é fundamental para o funcionamento celular, orgânico e sistêmico, sendo sua falta potencialmente prejudicial, alterando comportamento alimentar, regulação glicêmica, pressão arterial, processos cognitivos e eixos hormonais. Este estudo visa verificar os efeitos da privação de sono no balanço das vias de síntese e degradação proteica musculares, nas condições de privação de sono, assim como o impacto da privação de sono no processo de recuperação muscular, após o dano induzido pela criolesão ou toxina de cobra..

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos, utilizando metodologia de domínio do laboratório, com infra-estrutuda adequada..

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento externo - R\$ 47655,00.

**CRONOGRAMA:** 72 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Doutorado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 25/7/2011 e 24/7/2012.

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

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

Atenciosamente,



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

0764/10



## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alderton JM, Steinhardt RA. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10(6):268-72
2. Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Effects of chronic stress on steroid hormones secretion in male rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004a, 37:791-7.
3. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP; 2004b. 167 p.
4. Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res*. 2005;14(1):83-90.
5. Bentivoglio M, Grassi-Zucconi G. The pioneering experimental studies on sleep deprivation. *Sleep*. 1997;20(7):570-6.
6. Bhasin S, Woodhouse L, Storer TW. Androgen effects on body composition. *Growth Horm IGF Res*. 2003;13 Suppl A:S63-71.
7. Blaveri K, Heslop L, Yu DS, Rosenblatt JD, Gross JG, Partridge TA, Morgan JE. Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: studies on isolated fibers. *Dev Dyn*. 1999;216(3):244-56.
8. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001b;294(5547):1704-8.
9. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*. 2001a;3(11):1014-9.
10. Bonnet MH, Berry RB, Arand DL. Metabolism during normal, fragmented and recovery sleep. *J Appl Physiol*. 1991;71(3):1112-8.

11. Bueno OF, Oliveira MGM, Lobo LL, Morais PR, Melo FH, Tufik S. Cholinergic modulation of inhibitory avoidance impairment induced by paradoxical sleep deprivation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2000;24(4):595-606.
12. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol*. 1999;277(2 Pt 2):R601-6.
13. Castro M. Efeitos antiinflamatórios e antiproliferativos dos glicocorticóides: concordância ou discordância? *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005;49(3):334-6.
14. Chakravarthy MV, Davis BS, Booth FW. IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2000;89(4):1365-79.
15. Chakravarthy MV, Fiorotto ML, Schwartz RJ, Booth FW. Long-term insulin-like growth factor-I expression in skeletal muscles attenuates the enhanced in vitro proliferation ability of the resident satellite cells in transgenic mice. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(12):1303-20.
16. Chargé SB, Brack AS, Hughes SM. Aging-related satellite cell differentiation defect occurs prematurely after Ski-induced muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(4):C1228-41.
17. Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84(1):209-38.
18. Chen W, Fu X, Sheng Z. Review of current progress in the structure and function of Smad proteins. *Chin Med J (Engl)*. 2002;115(3):446-50.
19. Chen W, Kushida CA. Perspectives. In: *Sleep deprivation: basic science, physiology and behavior*. New York: Marcel Dekker. 2005;1-30p.
20. Cho JE, Fournier M, Da X, Lewis MI. Time course expression of Foxo transcription factors in skeletal muscle following corticosteroid administration. *J Appl Physiol*. 2010;108(1):137-45.
21. Chromiak JA, Vandenburg HH. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy in vitro is attenuated by mechanical stimulation. *Am J Physiol*. 1992;262(6 Pt 1):C1471-7.
22. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E, Glass DJ. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin

- heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.* 2007;6(5):376-85.
23. Close GL, Kayani A, Vasilaki A, McArdle A. Skeletal muscle damage with exercise and aging. *Sports Med.* 2005;35(5):413-27.
  24. Coenen AM, van Luijtelaar EL. Stress induced by three procedures of deprivation of paradoxical sleep. *Physiol Behav.* 1985;35(4):501-4.
  25. Cohen HB, Dement WC. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase. *Science.* 1965;150(701):1318-9.
  26. Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne GS. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci.* 1999;112 ( Pt 17):2895-901.
  27. Cornelison DD, Olwin BB, Rudnicki MA, Wold BJ. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol.* 2000;224(2):122-37.
  28. Crispim CA, Waterhouse J, Dâmaso AR, Zimberg IZ, Padilha HG, Oyama LM, Tufik S, de Mello MT. Hormonal appetite control is altered by shift work: a preliminary study. *Metabolism.* 2011 (*in press*).
  29. Daan S, Beersma DGM, Borbely AA. Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am J Physiol.* 1984;246(2 Pt 2):R161-83.
  30. Daddi L. Sulle alterazioni degli elementi del sistema nervoso centrale nell'insonnia sperimentale. *Rivista di Patologia Nervosa e Mentale.* 1898;3:1-12.
  31. Dal Pai-Silva M, Carvalho RF. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *Rev Bras Zootec.* 2007; 36(suplemento especial): 21-31.
  32. d'Albis A, Couteaux R, Janmot C, Roulet A, Mira JC. Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. *Eur J Biochem.* 1988;174(1):103-10.
  33. Dattilo M, Antunes HK, Medeiros A, Mônico Neto M, Souza HS, Tufik S, de Mello MT. Sleep and muscle recovery: Endocrinological and molecular basis for a new and promising hypothesis. *Med Hypotheses.* 2011;77:220-2.

34. De Manacéine M. Quelques observations experimentales sur l'influence de l'insomnie absolute. Arch Ital Biol. 1894; 21:332-5
35. Dement W. The effect of dream deprivation. Science. 1960;131:1705-7.
36. Dement WC, Kushida CA, Chang J. History of sleep deprivation. In: Kushida CA. Sleep Deprivation: Basic science, physiology and behavior. New York: Marcel Dekker, 2005;31-46p.
37. Dinges DF, Orne MT, Whitehouse WG, Orne EC. Temporal placement of a nap for alertness: contributions of circadian phase and prior wakefulness. Sleep. 1987;10(4):313-29.
38. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science. 1988;240(4854):889-95.
39. Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. Sleep. 1989;12(1):13-21.
40. Everson CA, Crowley WR. Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004;286(6):E1060-70.
41. Falduto MT, Czerwinski SM, Hickson RC. Glucocorticoid-induced muscle atrophy prevention by exercise in fast-twitch fibers. J Appl Physiol. 1990;69(3):1058-62.
42. Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. Endocr Rev. 1992;13(2):129-45.
43. Frey FJ, Odermatt A, Frey BM. Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2004;13(4):451-8.
44. Gao HB, Tong MH, Hu YQ, Guo QS, Ge R, Hardy MP. Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells. Endocrinology. 2002;143(1):130-8.
45. Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, Ketelslegers JM, Thissen JP. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. Endocrinology. 2007;148(1):452-60.
46. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. Genes Dev. 2000;14(2):121-41.

47. Godoi FR, Oliveira MG, Tufik S. Effects of paradoxical sleep deprivation on the performance of rats in a model of visual attention. *Behav Brain Res.* 2005;165(1):138-45.
48. Grobet L, Pirottin D, Farnir F, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Christians E, Desmecht D, Coignoul F, Kahn R, Georges M. Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis.* 2003;35(4):227-38.
49. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(5):589-610.
50. Gulevich G, Dement W, Johnson L. Psychiatric and EEG observations on a case of prolonged (264 hours) wakefulness. *Arch Gen Psychiatry.* 1966;15(1):29-35.
51. Hall-Craggs EC. Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaine (Marcain). *Exp Neurol.* 1974;43(2):349-58.
52. Hansen-Smith FM. Development and innervation of soleplates in the freely grafted extensor digitorum longus (EDL) muscle in the rat. *Anat Rec.* 1983;207(1):55-67.
53. Harris JB, Johnson MA. Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1978;5(6):587-600.
54. Hartley RS, Bandman E, Yablonka-Reuveni Z. Skeletal muscle satellite cells appear during late chicken embryogenesis. *Dev Biol.* 1992;153(2):206-16.
55. Heller HC. Sleep and hypometabolism. *Can J Zool.* 1988;66:61-69.
56. Hess WR. Le sommeil. *Compt Rend Hebdomad Seances Soc Biol.* 1931; 107:1333-60.
57. Hipólido DC, Suchecki D, Pimentel de Carvalho Pinto A, Chiconelli Faria E, Tufik S, Luz J. Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *J Neuroendocrinol.* 2006;18(4):231-8.
58. Hoshino K, Guimarães-Toloi JR. Neocortical spindling during wakefulness in the rat. *Braz J Med Biol Res.* 1995;28(3):337-42.
59. Huxley AF. Cross-bridge action: present views, prospects, and unknowns. *J Biomech.* 2000;33(10):1189-95.

60. Inder WJ, Jang C, Obeyesekere VR, Alford FP. Dexamethasone administration inhibits skeletal muscle expression of the androgen receptor and IGF-1--implications for steroid-induced myopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;73(1):126-32.
61. Ishimori K. True cause of sleep: a hypnogenic substance as evidenced in the brain of sleep-deprived animals. *Tokyo Igakkai Zasshi*. 1909;23:429-57.
62. Joubert Y, Tobin C, Lebart MC. Testosterone-induced masculinization of the rat levator ani muscle during puberty. *Dev Biol*. 1994;162(1):104-10.
63. Joubert Y, Tobin C. Satellite cell proliferation and increase in the number of myonuclei induced by testosterone in the levator ani muscle of the adult female rat. *Dev Biol*. 1989;131(2):550-7.
64. Joubert Y, Tobin C. Testosterone treatment results in quiescent satellite cells being activated and recruited into cell cycle in rat levator ani muscle. *Dev Biol*. 1995;169(1):286-94.
65. Jouvét D, Vilmon P, Delorme F, Jouvét M. Etude de la privation sélective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. *Compt Rend soc Biol*. 1964;158:756-9.
66. Kassam-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomès D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature*. 2004;431(7007):466-71.
67. Kavanau JL. Memory, sleep, and dynamic stabilization of neural circuitry: evolutionary perspectives. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996;20(2):289-311.
68. Kirk S, Oldham J, Kambadur R, Sharma M, Dobbie P, Bass J. Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol*. 2000;184(3):356-63.
69. Kleitman N. Studies on the physiology of sleep. V. Some experiments on puppies. *Am J Physiol*. 1927;84:386-395.
70. Koban M, Swinson KL. Chronic REM-sleep deprivation of rats elevates metabolic rate and increases UCP1 gene expression in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289(1):E68-74.
71. Kovacheva EL, Hikim AP, Shen R, Sinha I, Sinha-Hikim I. Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-

- Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. *Endocrinology*. 2010;151(2):628-38.
72. Krueger JM, Obal F. A neuronal group theory of sleep function. *J Sleep Res*. 1993;2(2):63-9.
73. Lavie P. The sleep theory of Constantin von Economo. *J Sleep Res*. 1993;2(3):175-8.
74. Lawlor MA, Feng X, Everding DR, Sieger K, Stewart CE, Rotwein P. Dual control of muscle cell survival by distinct growth factor-regulated signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 2000;20(9):3256-65.
75. Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9306-11.
76. Lefaucheur JP, Gjata B, Lafont H, Sebille A. Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J Neuroimmunol*. 1996;70(1):37-44.
77. Legendre R, Pieron H. Le probleme des facteurs resultats d'injections vasculaires et intra-cerebrales de liquids insomniques. *Compt Rend de la Soc de Biol*. 1910;68:1077-9.
78. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J, Salehian B. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(2):E363-71.
79. Martins PJ, Marques MS, Tufik S, D'Almeida V. Orexin activation precedes increased NPY expression, hyperphagia, and metabolic changes in response to sleep deprivation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298(3):E726-34.
80. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961;9:493-5.
81. Mello MT, Santana MG, Souza LM, Oliveira PC, Ventura ML, Stampi C, Tufik S. Sleep patterns and sleep-related complaints of Brazilian interstate bus drivers. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33(1):71-7.

82. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 2006;209(2):501-14.
83. McLennan IS, Koishi K. The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *Int J Dev Biol.* 2002;46(4):559-67.
84. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* 1997;387(6628):83-90.
85. Menconi M, Gonnella P, Petkova V, Lecker S, Hasselgren PO. Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes. *J Cell Biochem.* 2008;105(2):353-64.
86. Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve.* 1999;22(6):724-32.
87. Miyabara EH, Aoki MS, Soares AG, Moriscot AS. Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A. *Cell Tissue Res.* 2005;319(3):479-89.
88. Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestril R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(4):C1128-38.
89. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev.* 1987;8(1):1-28.
90. Mulvaney DR, Marple DN, Merkel RA. Proliferation of skeletal muscle satellite cells after castration and administration of testosterone propionate. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1988;188(1):40-5.
91. Musarò A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature.* 1999;400(6744):581-5.



92. Nedeltcheva AV, Kilkus JM, Imperial J, Schoeller DA, Penev PD. Insufficient sleep undermines dietary efforts to reduce adiposity. *Ann Intern Med.* 2010;153(7):435-41.
93. Nicastrro H, Gualano B, de Moraes WM, de Salles Painelli V, da Luz CR, Dos Santos Costa A, de Salvi Guimarães F, Medeiros A, Brum PC, Lancha AH Jr. Effects of creatine supplementation on muscle wasting and glucose homeostasis in rats treated with dexamethasone. *Amino Acids.* 2011 (*in press*).
94. NRC (National Research Council). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 7. ed. Washington DC: National Academy Press; 1996.
95. Nunes Jr GP, Tufik S. Validation of the modified multiple platform method (MMP) of paradoxical sleep deprivation in rats. *Sleep Res.* 1994; 23:419.
96. Nunes Junior GP, Tufik S, Nobrega JN. Autoradiographic analysis of D1 and D2 dopaminergic receptors in rat brain after paradoxical sleep deprivation. *Brain Res Bull.* 1994a;34(5):453-6.
97. Nunes Junior GP, Tufik S, Nobrega JN. Decreased muscarinic receptor binding in rat brain after paradoxical sleep deprivation: an autoradiographic study. *Brain Res.* 1994b;645(1-2):247-52.
98. Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K, Sugita H. Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle Nerve.* 1991;14(6):515-20.
99. Padilha HG, Crispim CA, Zimberg IZ, Folkard S, Tufik S, de Mello MT. Metabolic responses on the early shift. *Chronobiol Int.* 2010;27(5):1080-92.
100. Palma BD, Gabriel A Jr, Bignotto M, Tufik S. Paradoxical sleep deprivation increases plasma endothelin levels. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(1):75-9.
101. Patrick GTW, Gilbert JA. On the effects of loss of sleep. *Psychol Rev.* 1896; 3:469-83.
102. Pavlath GK, Thaloor D, Rando TA, Cheong M, English AW, Zheng B. Heterogeneity among muscle precursor cells in adult skeletal muscles with differing regenerative capacities. *Dev Dyn.* 1998;212(4):495-508.
103. Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(1):9-20.

104. Pilcher JJ, Bergmann BM, Fang VS, Refetoff S, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: XI. The effect of guanethidine-induced sympathetic blockade on the sleep deprivation syndrome. *Sleep*. 1990;13(3):218-31.
105. Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 1993;268(29):21455-8.
106. Rechtschaffen A, Bergmann BM. Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. *Behav Brain Res*. 1995;69(1-2):55-63.
107. Rechtschaffen A, Gilliland MA, Bergmann BM, Winter JB. Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science*. 1983;221(4606):182-4.
108. Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen R, Sinha-Hikim I, Hogue A, Fielder TJ, Gonzalez-Cadavid NF. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(4):E876-88.
109. Roberts P, McGeachie JK, Grounds MD. The host environment determines strain-specific differences in the timing of skeletal muscle regeneration: cross-transplantation studies between SJL/J and BALB/c mice. *J Anat*. 1997;191 ( Pt 4):585-94.
110. Roeths T, Roth T. Sleep-wake state and memory function. *Sleep*. 2000;23(Suppl 3):S64-8.
111. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol*. 2001;3(11):1009-13.
112. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 2000;21(1):55-89.
113. Schiaffino S, Serrano A. Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23(12):569-75.
114. Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve*. 2000;23(4):617-26.

115. Schultz E, Jaryszak DL, Valliere CR. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve*. 1985;8(3):217-22.
116. Shah OJ, Kimball SR, Jefferson LS. Glucocorticoids abate p70(S6k) and eIF4E function in L6 skeletal myoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(1):E74-82.
117. Siegel J M. Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*. 2005;437(27):1264-71.
118. Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI, Bhasin S. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(1):E197-205.
119. Snow MH. Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat Rec*. 1977;188(2):201-17.
120. Suchecki D, Antunes J, Tufik S. Palatable solutions during paradoxical sleep deprivation: reduction of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and lack of effect on energy imbalance. *J Neuroendocrinol*. 2003;15(9):815-21.
121. Suchecki D, Lobo LL, Hipolide DC, Tufik S. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res*. 1998;7(4):276-81.
122. Suchecki D, Tiba PA, Tufik S. Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. *J Neuroendocrinol*. 2002a;14(7):549-54.
123. Suchecki D, Tiba PA, Tufik S. Paradoxical sleep deprivation facilitates subsequent corticosterone response to a mild stressor in rats. *Neurosci Lett*. 2002b;320(1-2):45-8.
124. Suchecki D, Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav*. 2000;68(3):309-16.
125. Tarozzi G. Sull'influenza dell'insonnio sperimentale sul ricambio materiale. *Rivista di Patologia Nervosa e Mentale*. 1899;4:1-23.
126. Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(7):1022-32.

127. Timo-laria C, Negrão N, Schmidek WR, Hoshino K, Lobato de Menezes CE, Leme da Rocha T. Phases and states of sleep in the rat. *Physiol Behav.* 1970;5(9):1057-62.
128. Tufik S, Andersen ML, Bittencourt LRA, de Mello MT. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *An Acad Bras Ciênc.* 2009; 81(3): 521-38.
129. Tufik S, Lindsey CJ, Carlini EA. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology.* 1978;16(2):98-105.
130. Tufik S. Changes of response to dopaminergic drugs in rats submitted to REM-sleep deprivation. *Psychopharmacology (Berl).* 1981a;72(3):257-60.
131. Tufik S. Increased responsiveness to apomorphine after REM sleep deprivation: supersensitivity of dopamine receptors or increase in dopamine turnover? *J Pharm Pharmacol.* 1981b;33(11):732-8.
132. Van Cauter E, Latta F, Nedeltcheva A, Spiegel K, Leproult R, Vandenbril C, Weiss R, Mockel J, Legros JJ, Copinschi G. Reciprocal interactions between the GH axis and sleep. *Growth Horm IGF Res.* 2004;14 Suppl A:S10-7.
133. Van Hulzen ZJ, Coenen AM. Selective deprivation of paradoxical sleep and consolidation of shuttle-box avoidance. *Physiol Behav.* 1979;23(5):821-6.
134. Vandeburgh HH, Karlisch P, Shansky J, Feldstein R. Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. *Am J Physiol.* 1991;260(3 Pt 1):C475-84.
135. Webb WB. Sleep as an adaptative response. *Percept Motor Skills.* 1974;38:1023-7.
136. Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS, Sesodia S. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol.* 1990;141(1):24-40.
137. Williams HL, Lubin A, Goodnow JJ. Impaired performance with acute sleep loss. *Psychol Monogr.* 1959;73(14):1-26.
138. Yin D, Gao W, Kearbey JD, Xu H, Chung K, He Y, Marhefka CA, Veverka KA, Miller DD, Dalton JT. Pharmacodynamics of selective androgen receptor modulators. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304(3):1334-40.

139. Zhao W, Pan J, Zhao Z, Wu Y, Bauman WA, Cardozo CP. Testosterone protects against dexamethasone-induced muscle atrophy, protein degradation and MAFbx upregulation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;110(1-2):125-9.
140. Zhu X, Hadhazy M, Wehling M, Tidball JG, McNally EM. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Lett.* 2000;474(1):71-5.

**ABSTRACT**

**Introduction:** Paradoxical sleep deprivation (PSD) in rats is able to induce reductions in body mass and body fat, due to increased secretion of pituitary-adrenal axis hormones. Considering that PSD is also associated with a decrease in anabolic hormones, skeletal muscle can also be strongly influenced, causing atrophy damaging its recovery after a lesion. **Objectives:** To evaluate body mass, hormone profile and *tibialis anterior* (TA) muscle histomorphometry after cryolesion or no damage. **Method:** To achieve the proposed objectives, two experiments were conducted. In the first, 3-month-old male Wistar rats (9 to 10 per group) were subjected to 96 hours of PSD (PSD group) or 96 hours of sleep (CTRL group). In the second experiment, 3-month-old male Wistar rats (8 to 9 per group) were first subjected to cryolesion and then divided in the following groups: PSD for 96 hours (Group D-PSD) or sleep for 96 hours (D-CTRL group); or 2) PSD for 96 hours followed by 96 hours of sleep *ad libitum* (sleep rebound – D-RB group) or sleep for 192 hours (D-CTRL-RB group). Blood corticosterone and testosterone levels and TA muscle histomorphometry were determined, both in damaged and healthy muscles. **Results:** In experiment 1, we observed reductions in body mass, muscle mass and cross-sectional area of TA in the PSD group, and increased levels of corticosterone and decreased levels of testosterone. In the second experiment, the histomorphometry of the TA not damaged and the hormonal parameters of D-PSD group were similar to experiment 1, while the TA damaged showed decreases in its mass in comparison to D-CTRL and D-CTRL-RB groups. Although the cross-sectional area of the damaged area was lower compared to healthy TA on the D-PSD group, it was not different from the damaged TA of CTRL-D group. However, the D-RB group presented the TA mass and AST significantly higher than the PSD-group, but lower than the D-CTRL-RB and D-RB groups. **Conclusion:** PSD is associated with TA atrophy and impaired ability to recover from damage induced by cryolesion, possibly because of hormonal responses associated with PSD.

Dáttilo, Murilo

**A privação de sono paradoxal em ratos está associada a atrofia muscular e déficit na recuperação muscular** / Murilo Dáttilo.-- São Paulo, 2011.

xviii, 86f.

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

Título em inglês: Paradoxical sleep deprivation is related to muscle atrophy and damages muscle recovery.

1.Privação de sono paradoxal. 2.Recuperação muscular. 3.Atrofia muscular. 4.Testosterona. 5.Corticosterona.