

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**DISSERTAÇÃO**

**MODULAÇÃO DA FUNÇÃO TIREÓIDEA E DA IODOTIRONINA  
DESIODASE TIPO 2 APÓS PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL E  
RESTRIÇÃO DE SONO EM RATOS**

**NAYANA COUTINHO RODRIGUES**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**MODULAÇÃO DA FUNÇÃO TIREÓIDEA E DA IODOTIRONINA  
DESIODASE TIPO 2 APÓS PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL E  
RESTRICÇÃO DE SONO EM RATOS**

*Sob a Orientação da Professora*

**MICHELLE PORTO MARASSI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – PMPGCF– para obtenção do Título de **Mestre** em Ciências Fisiológicas.

SEROPÉDICA, RJ  
MAIO DE 2012





Departamento de  
Ciências  
Fisiológicas



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

NAYANA COUTINHO RODRIGUES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Fisiologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 02/05/2012

*Michelle Porto Marassi*

Assinatura

Michelle Porto Marassi Dr<sup>a</sup>, UFRRJ  
(Orientador)

*Alba Cenélia Matos da Silva*

Assinatura

Alba Cenélia Matos da Silva Dr<sup>a</sup>. UFRRJ

*Andrea C.F. Ferreira*

Assinatura

Andrea Claudia Freitas Ferreira, Dr<sup>a</sup>. UFRJ.

**Essa dissertação foi realizada na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas –PMPGCF, no período de março de 2010 a abril de 2012, com apoio financeiro da Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq e Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa – AFIP.**

## *Agradecimentos*

*As mulheres da minha vida!!*

*Sulema, Sonia e Solange Delocco Coutinho, Alice Ononeri Rodrigues e Leila Pereira S. Giordano agradeço pela união de suas forças para possibilitar que eu conquistasse cada sonho que consegui até hoje, dando-me amor, exemplos, dedicação e principalmente orientação para que eu sempre ande para frente sem envergonhar-me de nenhuma das decisões erradas que muitas vezes posso ter tido e que ainda posso ter, pois com elas aprendi que errar é humano, mas reconhecer nossos erros e transforma-los em atitude é o que realmente faz tornarmos seres humanos melhores.*

*A memória de meu avô Waldir Neves Coutinho, que com todas as suas dificuldades físicas - que não foram poucas - nos deixou o exemplo de que nossa vida só é limitada quando limitamos os nossos horizontes*

*Gratidão Eterna!!!*

*Muito obrigada!!!*

## *Agradecimentos especiais*

*A minha orientadora*

*Michelle Porto Marassi*

*Por toda orientação, paciência, por todas as broncas e elogios, pela confiança dada à mim. Obrigada!! Que esta minha conquista seja a primeira de muitas que compartilharemos neste meu caminho.*

*À professora*

*Alba Cenília M. da Silva*

*Por toda ajuda dada a mim, ensinando-me que devemos sempre fazer as coisas corretamente e que o segredo da felicidade é amar a vida e aquilo que escolhemos para ela.*

*À professora*

*Denise Pires de Carvalho*

*Pela colaboração dada ao nosso grupo que nos permitiu ter partes dos nossos resultados.*

*À professora*

*Monica Levy Andersen*

*Por toda colaboração na elaboração dos grupos experimentais, bem como sua na realização dos mesmos, abrindo espaço no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo, onde parte do protocolo experimental deste trabalho foi realizado.*

*Ao professor*

*Emerson Lopes Olivares*

*Por toda ajuda na elaboração do artigo, bem como recados e documentos enviados e recebidos por ele enquanto minha orientadora estava de licença maternidade, mas que nunca deixou de me orientar mesmo longe fisicamente*

*Ao Professor*

*Jairo Pinheiro da Silva*

*Por toda amizade e boa vontade de nos ceder espaço, pela sua presença indispensável no bem estar de nosso laboratório.*

*À minhas amigas de laboratório,*

*Cristine de Paula Nascimento e Natália S. Cruz, Patricia Gonzaga, Rodrigo Rodrigues pelo companheirismo, em todos os momentos, por acreditarem e me ajudarem em cada momento deste trabalho, muito Obrigada!!*

*A todos os alunos do departamento*

*Pelos momentos de união, pelas trocas de informações e todas as discussões que estão possibilitando tamanho crescimento em nosso departamento.*

*A todos os professores e funcionários do departamento*

*Pela dedicação, ajuda e crença dedicada a nós, estando todos sempre dispostos a nos orientar e tentando melhorar nossas condições de trabalho através da formação de uma equipe que une forças para o bem e sucesso de nosso departamento.*



*“Embora ninguém possa voltar atrás e, fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

*Chico Xavier*

## RESUMO

RODRIGUES, Nayana Coutinho. **Projeto: Modulação da Função Tireóidea e da Iodotironina Desiodase tipo 2 após Privação de Sono Paradoxal e Restrição de Sono em Ratos.** 2012. 50. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

A vida moderna vem encurtando o tempo de sono e as consequências da diminuição do sono tem sido estudada em humanos e modelos animais. Considerando que a relação real entre a privação de sono e a função tireóidea não foi totalmente elucidada, o objetivo deste trabalho foi avaliar a função tireóidea e a atividade da desiodase tipo 2 (D2) durante a privação de sono paradoxal (PSP) e restrição de sono (RS) e após período de sono rebote de 24 horas. Ratos machos (200-250g) foram submetidos à privação de sono pela metodologia das plataformas múltiplas modificada. Os animais foram distribuídos em 7 grupos: Controle (n=11); PSP por 24 (n=15) e 96 horas (n=13); com seus respectivos grupos rebote (PSP24R, n=12 e PSP96R, n=14); RS por 21 dias (n=14); e com o período de rebote de 24 horas (RS21R, n=15). Todos os animais foram pesados e eutanasiados no mesmo dia. A glândula tireoide foi pesada, sangue coletado para análise de T3 e T4 por Eletroquimioluminescência, corticosterona e TSH por Radioimunoensaio. A glândula hipófise e o tecido adiposo marrom (TAM) foram usados para analisar a atividade da D2 em 6 grupos (n=5/grupo). Para avaliar a atividade *in vivo* do co-transportador Na<sup>+</sup>/I (NIS), os animais receberam Na-<sup>125</sup>I (250.000 dpm, i.p.) e após 15 minutos os animais foram eutanasiados e a radiatividade da glândula foi mensurada utilizando um contador de partículas gama (Wizard). O ganho de peso ( $\Delta$ ) diminuiu nos grupos PSP24, PSP96 e PSP96R e o período de rebote foi capaz de normalizar esses valores apenas na em 24 horas de privação de sono, a RS e seu período de rebote também foram capazes de diminuir o ganho de peso corporal. O peso absoluto e relativo da glândula tireoide e a atividade do NIS não tiveram diferenças significativas. Por outro lado, os níveis séricos de T3 aumentaram em todos os grupos em relação ao grupo controle. Os níveis séricos do T4 diminuíram nos grupos PSP24, PSP96 e PSP96R em relação ao controle. Os níveis séricos de TSH diminuíram nos grupos PSP24, PSP24R e PSP96, entanto o período de rebote foi capaz de normalizar os valores de TSH em 96 horas. No TAM a atividade da D2 aumentou apenas nos grupos PSP por 24 ou 96 horas, e na hipófise a D2 diminuiu nos grupos PSP24, PSP96R e RS21R. Os níveis séricos de T3 aumentaram na privação de sono seletiva e crônica, e o período de rebote não foi capaz de normalizar estas alterações. Controversamente, o T4 diminuiu apenas na privação de sono paradoxal, o que pode ser explicado pela diminuição dos níveis de TSH e aumento da atividade da D2 no TAM. O sono rebote normalizou os valores de T4 após privação de sono paradoxal aguda (24 horas), sugerindo que a modulação da função tireóidea é diferente em relação à privação de sono seletiva e crônica.

**Palavras-Chave:** Hormônios Tireóideos; Iodotironina Desiodase Tipo 2; Privação de Sono.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Nayana Coutinho. **Project: Modulation of Thyroid Function and Type 2 Iodothyronine Deiodinase after Paradoxical Sleep Deprivation and Sleep Restriction in Rats.** 2012. 50 p. Dissertation (Master Science in Physiology Science), Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

Modern life shortened sleep time and the consequences of the sleep loss have been examined in humans and animal models. Considering that the complete association between thyroid function and sleep loss has not been fully investigated, the aim of this study was to analyze thyroid function and type 2 deiodinase (D2) activity during paradoxical sleep deprivation (PSD) and sleep restriction (SR) and after 24 hours of rebound sleep period. Male Wistar rats (200-250g) underwent sleep deprivation by modified multiple platform method. The animals were assigned in 7 groups: control (n=11); PSD for 24 (n=15) and 96 hours (n=13); respective rebound groups (PSD24R, n=12 and PSD96R, n=14); SR for 21 days (n=14); and SR21 with rebound of 24 hours (SR21R, n=15). All animals were weighed and euthanized on the same day. Thyroid gland was weighed and blood samples were collected for T3 and T4 analysis by Electrochemiluminescence, corticosterone and TSH analysis by RIE. Pituitary gland and brown adipose tissue (BAT) were used for D2 activity in 6 groups (n=5/group). To evaluate the *in vivo* Na<sup>+</sup>/I symporter (NIS) function, the animals received Na-<sup>125</sup>I (250,000 dpm, i.p.) 15 min before decapitation, and the radioactivity of the thyroid glands was measured using a gamma counter (Wizard). The body weight gain ( $\Delta$ ) decreased in PSD24, PSD96 and PSD96R and rebound period was able to normalize these values only in 24 hour of sleep deprivation group, SR and its rebound period also decreased the body weight gain. The absolute and relative thyroid weight and NIS activity did not significantly change. Whilst serum T3 increased in all groups in relation to control. Serum T4 decreased in PSD24, PSD96 and PSD96R in relation to control. Serum TSH decreased in PSD24, PSD24R and PSD96 compared to control, whereas the rebound period was able to normalize TSH values only in 96 hour. In BAT, D2 activity increased only in PSD 24 or 96h groups and in pituitary D2 decreased in PSD24, PSD96R and SR21R. Serum T3 increased after selective and chronic sleep loss, and the sleep rebound was not able to normalize these changes. Conversely, T4 decreased only after paradoxical sleep deprivation, which can be explained by decreased serum TSH and increased D2 activity in BAT. Sleep rebound normalized T4 values after acute paradoxical sleep deprivation (24h), suggesting differential modulation of thyroid function in relation to chronic and selective sleep loss.

**Key words:** Thyroid Hormones, Type 2 Iodothyronine Deiodinase, Sleep Loss.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Padrões eletroencefalográfico (EEG) e eletrooculográfico (EOG), eletrodo no núcleo geniculato lateral (LGN) e padrão eletromiográfico (EMG), nos diferentes estágios: vigília, sono não-REM e sono REM (adaptado de Rechtschaffen e Siegel, 2000).

**Figura 2.** Fases do ciclo do sono: vigília, sono REM e fases 1, 2, 3 e 4 do sono não-REM em diferentes fases da vida: infância, adulto e idosos ( adaptado de Rechtschaffen e Siegel, 2000).

**Figura 3:** Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireóideos. I<sup>-</sup>: iodeto; NIS: co-transportador Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>; Tg: tireoglobulina; MIT: monoiotirosina; DIT: diiodotirosina; T4: tiroxina; T3: triiodotironina; D1: desidase tipo 1. Fonte: acervo do Laboratório de Fisiologia Endócrina Dra. Doris Rosenthal.

**Figura 4.** Representação esquemática da cascata de desidodação das iodotironinas. Vias de ativação ou inativação das iodotironinas pelas enzimas desidodases tipo 1 (D1), 2 (D2) e 3 (D3). Adaptado de Leonard & Visser, 1986 e Bianco *et al.*, 2002.

**Figura 5.** Perfil hormonal do hormônio do crescimento (GH), cortisol, hormônio tireoestimulante (TSH) e Prolactina (PRL) de 8 homens adultos jovens durante o sono noturno, 28 horas de privação de sono e 8 horas de sono diurno (modificado de Van Cauter *et al.*, (1991); Van Cauter e Spiegel.,1999).

**Figura 6.** Foto representativa da metodologia da privação de sono paradoxal (Alvarenga, 2008).

**Figura 7.** Esquema temporal (D, dias) representativo dos grupos experimentais. Controle, restritos de sono paradoxal por 21 dias (RS21) e restritos de sono 21 dias com sono rebote de 24h (RS21R), privados de sono paradoxal por 96h (PSP96) ou 24h (PSP24) e estes com sono rebote de 24h (PSP96R e PSP24R, respectivamente).

**Figura 8.** Ganho de peso corporal dos animais nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 24 horas com período de rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período de rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de rebote por 24 horas (RS21R).

**Figura 9.** Níveis séricos de corticosterona nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período rebote por 24 horas (RS21R).

**Figura 10.** Peso absoluto da tireóide (A) e o peso relativo da tireoide (B) (peso da tireóide em mg/peso do animal em g) nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), PSP24 com período rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), PSP96 com período rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e RS21 com período rebote de 24 horas (RS21R).

**Figura 11.** Níveis séricos de T3 nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 24 horas com período de rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período de rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de rebote por 24 horas (RS21R).

**Figura 12.** Níveis séricos de T4 nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 24 horas com período de sono rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de sono rebote por 24 horas (RS21R).

**Figura 13.** Níveis séricos de TSH nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 24 horas com período de rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período de rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de rebote por 24 horas (RS21R).

**Figura 14.** Atividade da desidase tipo 2 (D2) no tecido adiposo marrom (TAM) dos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas, com período de rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de rebote por 24 horas (RS21R).

**Figura 15.** Gráfico mostrando a atividade da D2 na hipófise nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas, com período de rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de rebote por 24 horas (RS21R).

**Figura 16.** Atividade do co-transportador sódio/iodeto na tireoide dos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 24 horas com período de rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período de rebote de 24 horas (PSP96R).

## LISTA DE ABREVEATURAS

<b>EEG</b>	Registro eletroencefalográfico
<b>REM</b>	Sono de movimentos oculares rápidos ( <i>do inglês rapid eye movement</i> )
<b>GH</b>	Hormônio do crescimento
<b>HT</b>	Hormônios tireoideos
<b>TRH</b>	Hormônio liberador de tirotrofina
<b>TSH</b>	Hormônio estimulador da tireoide
<b>NIS</b>	co-transportador $\text{Na}^+/\text{I}^-$ , <i>Natrium Iodide Symporter</i>
<b>MIT</b>	Monoiodotrofina
<b>DIT</b>	Diiodotirosina
<b>TPO</b>	Enzima tireoperoxidase
<b>D1 e D2</b>	Iodotironina desidases tipo 1 e tipo 2
<b>TAM</b>	Tecido adiposo marrom
<b>ACTH</b>	Hormônio adenocorticotrópico
<b>PSP</b>	Privação de sono paradoxal
<b>RS</b>	Restrição de sono

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVEATURAS</b>	<b>Xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
2.1 Sono	5
2.2 Vigília	6
2.3 Sono não-REM	6
2.4 Sono REM	7
2.5 Sono e Regulação Hormonal	8
2.6 Hormônios Tireóideos	8
2.7 Desiodase Tipo 2	12
2.8 Privação de Sono e o Sistema Endócrino	13
2.9 Privação de Sono e Hormônios Tireóideos	16
<b>3 OBJETIVO</b>	<b>19</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
4.1 Animais	21
4.2 Protocolo de Privação/Restrição de sono	21
4.3 Protocolo Experimental	22
4.4 Procedimentos Gerais e Coleta de Tecidual	23
4.5 Dosagens Séricas de Corticosterona	24
4.6 Dosagens Séricas de T3 e T4	24
4.7 Dosagem Sérica de TSH	24
4.8 Atividade da Desiodase Tipo 2	25
4.9 Atividade do Co-transportador Sódio/iodeto (NIS)	26
4.10 Análise Estatística	26

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
5.1 Ganho de Peso Corporal	28
5.2 Níveis Séricos de Corticosterona	29
5.3 Peso da Tireoide	30
5.4 Dosagem Sérica de T3	31
5.5 Dosagem Sérica de T4	32
5.6 Dosagem sérica de TSH	33
5.7 Desiodase Tipo 2 no Tecido Adiposo Marrom	34
5.8 Desiodase Tipo 2 na Hipófise	35
5.9 Atividade do Co-transportador sódio/iodeto	36
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>43</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>





## 1 INTRODUÇÃO

Historicamente o tempo que os seres humanos passa dormindo ocupa 1/3 do tempo total da vida de cada indivíduo. O ciclo vigília sono ocorre em todos os vertebrados e a manutenção e a periodicidade deste ciclo é muito importante para a homeostase de todos os organismos. A vida contemporânea tem encurtado o tempo de sono do homem devido a uma série de exigências da sociedade moderna como aumento da jornada de trabalho, excesso de plantões, excesso de estudo, disponibilidade de entretenimento entre outras atividades imposta pela sociedade contemporânea. O efeito do encurtamento do tempo de sono na manutenção da homeostase dos organismos tem sido extensivamente estudado nos últimos anos em humanos e em modelos animais.

O ciclo vigília sono é dividido em três fases: Vigília, sono REM e sono não-REM, que se diferem por seus padrões de atividades das ondas corticais que são identificados por registros eletroencefalográficos. A vigília e o sono REM são caracterizados pelo aumento da frequência e diminuição das ondas corticais e o sono não-REM é caracterizado pela diminuição da frequência e aumento da amplitude destas ondas, no entanto nesta fase do sono não ocorre atonia muscular. O sono REM apesar de possuir padrões eletroencefalográficos muito semelhantes ao da vigília é acompanhado de uma intensa atonia muscular identificada por registros de eletromiograma e movimentos voluntários do globo ocular, por esses motivos esta fase de sono foi identificada de REM (do inglês, rapid eyes movement) e posteriormente de sono paradoxal pela semelhança de seus registros com a vigília seguido de atonia muscular.

Muitos trabalhos demonstraram os efeitos da restrição ou mesmo da privação de sono em humanos e animais, como alterações metabólicas, hormonais, cognitivas e comportamentais, bem como efeitos de sinalização e proliferação celular e efeitos nos mecanismos centrais responsáveis pela síntese, secreção e reconhecimento hormonal que são mecanismos essenciais para manutenção da homeostase.

A glândula tireoide é responsável pela síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (HT) tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), a modulação da atividade desta glândula é feita através de mecanismos centrais no hipotálamo e na glândula hipófise que produzem TRH e TSH respectivamente. O TSH é liberado na corrente sanguínea e através da sua ligação com seu receptor, presente na membrana da célula da tireoide estimula a síntese de T4 e T3, o T4 é classicamente conhecido como pró-hormônio, pois o hormônio tireoidiano que possui atividade biológica é o T3, devido sua afinidade pelo receptor de hormônio tireóideo. O T4 é convertido em T3 através da atividade das iodotironinas desidases tipos 1, 2 e 3 (D1, D2 e D3, respectivamente), que são capazes de promover a desidatação do anel externo do T4 (D1 e D2) produzindo T3 ou do anel interno do T4 (D2 e D3) produzindo T3 reversa, que parece também não ter atividade biológica, assim essas enzimas são responsáveis pela ativação ou inativação dos hormônios tireóideos.

Os receptores de hormônio tireóideo estão presentes em praticamente todos os tecidos, já é bem descrito os efeitos dos HT no metabolismo, crescimento e desenvolvimento, muitos estudos tem demonstrado que outros eixos endócrinos bem como alterações ambientais são capazes de alterar a modulação da função tireóidea. Alterações nos hormônios gonadais, na atividade do sistema autônomo simpático, na temperatura ambiental, bem como a quantidade alimentar de ingestão de iodo e fatores estressantes tem sido demonstrado modular positiva ou negativamente a função tireóidea.

Estudos sobre o efeito da restrição e da privação de sono na modulação da função tireóidea são escassos, com isso neste trabalho nosso objetivo foi avaliar modulação da função tireóidea e na atividade da iodotironinas desidase tipo 2 após privação de sono paradoxal e restrição seletiva de sono em ratos.

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Sono

O sono é considerado essencial para a vida e para a manutenção da saúde. O sono é uma fase da vida de todos os vertebrados muito importante para manutenção da homeostase, é durante o sono que muitos hormônios são sintetizados e liberados. Os mecanismos endócrinos e ambientais responsáveis pelo ciclo vigília-sono em humanos e roedores já são bem definidos (Alvarenga, 2008).

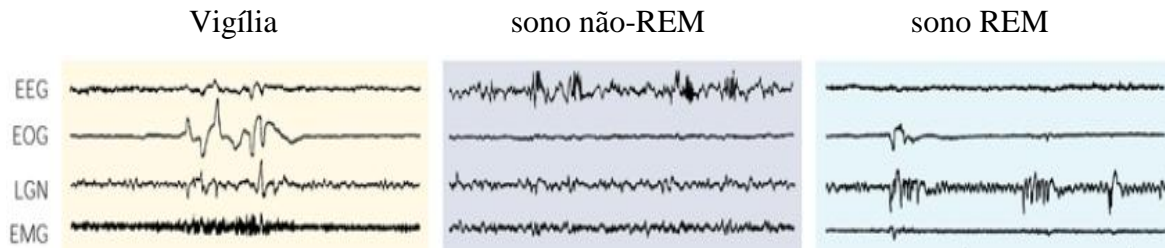
Em mamíferos, o sono e a vigília representam dois estados fisiológicos normalmente definidos por meio de métodos eletroencefalográficos. Ambos os processos, circadiano e homeostático, são conhecidos por regular o ciclo entre esses dois estados (Borbély, 1982).

Com o advento do registro eletroencefalográfico (EEG) por Hans Berger em 1929 e com a descrição de distintos padrões EEG presentes durante o sono por Davis *et al.*(1937), tornou-se evidente a relação entre a fenomenologia do sono e os potenciais elétricos do sistema nervoso. Em 1953, Aserinsky e Kleitman descreveram a ocorrência clínica de movimentos oculares rápidos durante o sono associado ao aumento da atividade cortical; em 1957, Dement e Kleitman demonstraram que a atividade ocular ocorria simultaneamente à fase dessincronizada do sono, e, por isso, utilizaram a denominação de “sono de movimentos oculares rápidos” (REM, do inglês *rapid eye movement*). O sono REM por possuir padrão eletroencefalográfico análogo ao da vigília, porém associado à acentuada diminuição do tônus muscular, foi denominado sono paradoxal, por Jouvet e Michel em 1959.

O ciclo circadiano exerce grande influência nos estágios vigília - sono, o estímulo luminoso sensibiliza o trato retino-hipotalâmico e, esta sensibilização pode ativar ou inativar o período de vigília dependendo do relógio biológico de cada animal, no entanto, o ciclo circadiano é endógeno podendo existir sem estímulos ambientais (Rechtschaffen e Siegel, 2000).

O sono exerce um efeito modulatório importante na maioria dos componentes do sistema endócrino. O impacto do sono e do seu encurtamento na função endócrina e no metabolismo tem sido estudado extensivamente tanto em humanos quanto em roedores nos últimos anos (Alvarenga, 2008; Tufik, 1978; Lobo, 1997).

O ciclo vigília - sono em humanos e roedores é classificado em 3 estágios: vigília, sono REM e sono não-REM que se diferenciam por seus padrões eletroencefalográficos (Figura 1).



**Figura 1.** Padrões eletroencefalográfico (EEG) e eletrooculográfico (EOG), eletrodo no núcleo geniculato lateral (LGN) e padrão eletromiográfico (EMG), nos diferentes estágios: vigília, sono não-REM e sono REM (adaptado de Rechtschaffen e Siegel, 2000).

## 2.2 Vigília

A vigília, também conhecida como desperto, é caracterizada por apresentar um padrão eletroencefalográfico dessincronizado de alta frequência ( $>25$  Hz) e baixa amplitude ( $<50\mu\text{V}$ ), podendo aparecer ritmo theta (5 – 8 Hz), além disso, o canal do eletromiograma apresenta um traçado de alta amplitude ( $>40\mu\text{V}$ ) (Rechtschaffen e Siegel, 2000). No homem o período de vigília é iniciado na fase clara enquanto nos roedores este período ocorre durante a fase escura (Alvarenga, 2008).

## 2.3 Sono não-REM

O sono não-REM é caracterizado pela diminuição das atividades neural, da taxa metabólica, da temperatura corpórea, da atividade simpática, da pressão arterial e da frequência cardíaca, porém nesta fase não ocorre atonia muscular (Rechtschaffen e Siegel, 2000).

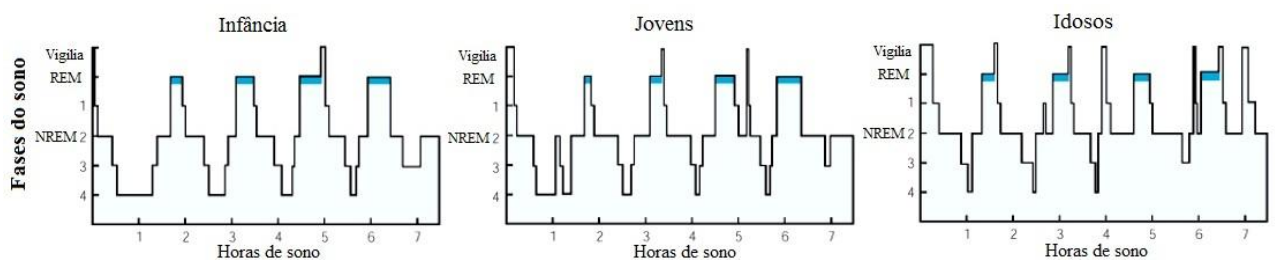
Esta fase do sono é também conhecida como sono sincronizado, pois este estágio possui quatro fases: 1, 2, 3 e 4 que se alternam e podem ser identificadas por seus padrões de eletrooculograma, eletromiograma e eletroencefalograma (Rechtschaffen e Siegel, 2000) (Figura 1).

Alguns hormônios são liberados nesta fase, como o hormônio do crescimento (GH), que exerce um papel importante no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em mamíferos, o aumento de ACTH leva a uma diminuição da amplitude dos picos de liberação do GH (Axel e Steiger, 2006). A fase não-REM, parece ser a fase em que a energia é conservada e o sistema nervoso central, assim como outros sistemas, é capaz de se restabelecer (Tufik *et al.*, 2008).

## 2.4 Sono REM

O sono REM é caracterizado por um aumento da atividade neural e diminuição do tônus muscular, seu registro de EEG é caracterizado por uma diminuição da amplitude ( $<50\mu\text{V}$ ) e um aumento da frequência ( $>40\text{ Hz}$ ) das ondas corticais, além de possuir ondas com ritmo Theta (8-5 Hz) (Timon-Laria *et al.*, 1970; Bergmann *et al.*, 1989; Andersen *et al.*, 2001).

Nesta fase muitos hormônios são sintetizados e liberados ou inibidos, sendo esta fase do sono essencial para a manutenção da homeostase. Durante todo o período de sono, os episódios de sono REM e não-REM se alternam ciclicamente e são diferentes de acordo com a idade (Rechtschaffen e Siegel, 2000) (Figura 2).



**Figura 2.** Fases do ciclo do sono: vigília, sono REM e fases 1, 2, 3 e 4 do sono não-REM em diferentes fases da vida: infância, adulto e idosos ( adaptado de Rechtschaffen e Siegel, 2000).

## 2.5 Sono e Regulação Hormonal

O sono é um importante modulador de vários sistemas endócrinos. Muitos estudos comprovam que o seu encurtamento ou mesmo privação causam muitos problemas comportamentais, fisiológicos e endócrinos entre outros (Alvarenga, 2008).

Takahashi *et al.* (1968) demonstraram que a concentração plasmática de hormônio do crescimento (GH) atinge seu pico em 90 minutos (entre as fases 3 e 4 do sono não-REM) após o início do sono em humanos. Apesar de existirem diversos estudos relacionando a síntese e secreção do GH com o sono, os mecanismos desta relação ainda não são bem esclarecidos (Alvarenga, 2008).

Os glicocorticoides também apresentam oscilações durante o ciclo vigília-sono. Estudos demonstram que, em humanos, a liberação de cortisol normalmente atinge os valores máximos nas primeiras horas da manhã (das 4 às 8 horas), declinando durante o dia até apresentar as menores concentrações no início do sono (Salgado-Delgado *et al.*, 2008). Essas alterações também são demonstradas em roedores, porém as concentrações de corticosterona se encontram aumentadas no início do período escuro, onde predomina a atividade desses animais (Shadab *et al.*, 2008).

Também podemos observar uma relação da liberação dos hormônios gonadais durante as fases do sono. Evans *et al.* (1971) e Lejeune *et al.* (1987) demonstraram que as concentrações de testosterona são baixas durante o início do sono em homens e apresentam níveis máximos nas primeiras horas da manhã.

## 2.6 Hormônios Tireóideos

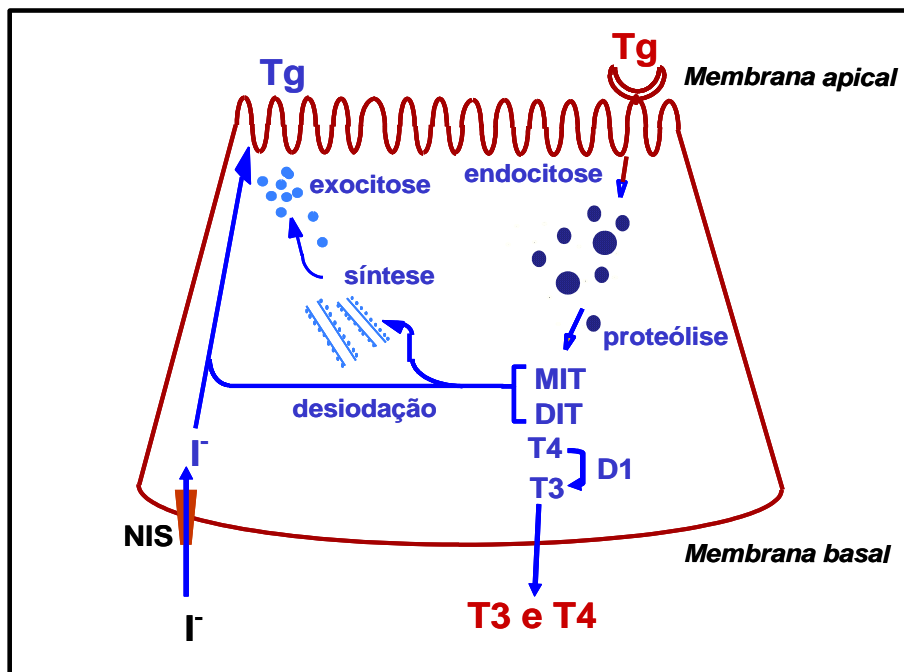
A glândula tireoide é responsável pela síntese e secreção dos hormônios tireoideos (HT), 3,5,3',5'- tetraiodotironina (tiroxina ou T4) e, em menor quantidade, de 3,5,3'- triiodotironina (T3), sendo estes importantes para o crescimento e desenvolvimento normais (Greenspan, 1994). Os HT desempenham papel fundamental no metabolismo, além de serem necessários para a função normal de quase todos os tecidos (Yen, 2001).

A função tireoidea é modulada por um sistema de *feedback* negativo que envolve o hipotálamo, a hipófise e a glândula tireoide. O TRH (hormônio liberador de tirotrófina), sintetizado pelo núcleo paraventricular do hipotálamo, age nas células tireotróficas da hipófise, estimulando a produção de TSH (hormônio estimulador da tireoide). O TSH é o



principal modulador da síntese e secreção dos hormônios tireóideos. O aumento dos níveis séricos dos HT regula negativamente a secreção de TRH e TSH (Yen, 2001).

A síntese dos hormônios tireóideos depende de várias etapas: síntese e transporte da tireoglobulina (Tg), transporte do iodeto pela membrana basal (através do co-transportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ , *Natrium Iodide Symporter*, NIS), oxidação do iodeto e subsequente iodação dos resíduos tirosil da Tg e acoplamento das iodotirosinas (MIT e DIT, mono e diiodotirosina, respectivamente). O processo de acoplamento das iodotirosinas ocorre separadamente da iodação e, é também catalisada pela enzima tireoperoxidase (TPO), o acoplamento de uma molécula de MIT e uma molécula de DIT leva a formação do T3 ou rT3, enquanto o acoplamento de duas moléculas de DIT leva a formação do T4 (Larsen *et al.*, 1998) (Figura 3).

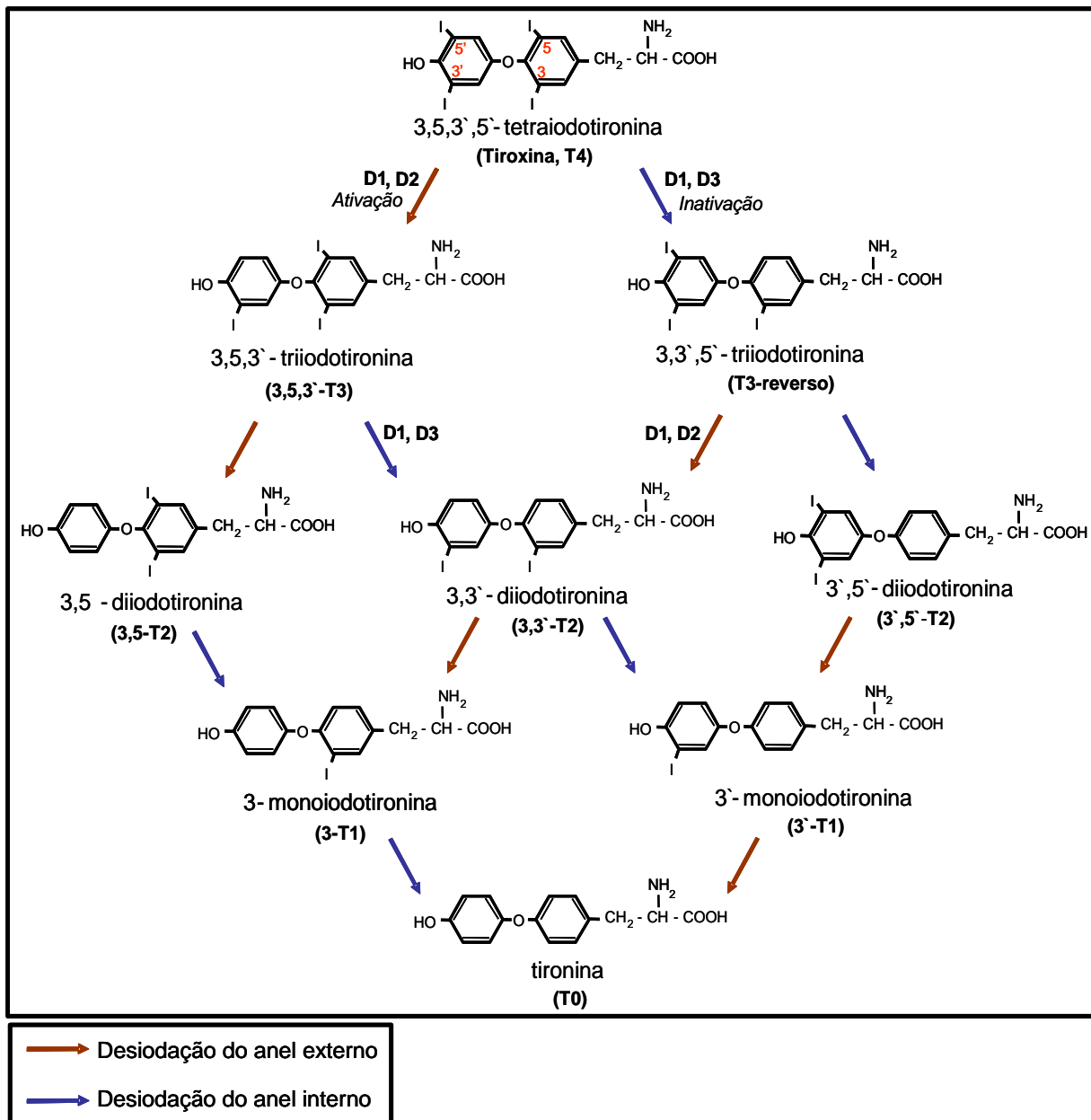


**Figura 3:** Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireóideos.  $\text{I}^-$ : iodeto; NIS: co-transportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ ; Tg: tireoglobulina; MIT: monoiodotirosina; DIT: diiodotirosina; T4: tiroxina; T3: triiodotironina; D1: desiodase tipo 1. Fonte: acervo do Laboratório de Fisiologia Endócrina Dra. Doris Rosenthal.

Diferentemente do T4, que é gerado exclusivamente pela glândula tireoide, a maior parte do T3 sérico é produzida pela desiodação periférica do T4. Na década de 70 foi demonstrado pela primeira vez que o T3 não é produzido apenas pela tireoide, pois foi detectada a presença de T3 no plasma de pacientes tireoidectomizados com reposição de T4, comprovando a existência de um processo periférico de desiodação (T4→T3) (Germain & Galton, 1997). Esta desiodação é catalisada pelas enzimas denominadas iodotironinas desiodases, presentes em todos os vertebrados, que podem tanto ativar o T4 quanto inativar os hormônios tireoideos dependendo de sua ação no anel fenólico ou tirosílico. Este processo de ativação ou inativação, catalisado por estas enzimas, indicam que a desiodação é um componente intrínseco da homeostase dos hormônios tireóideos (Bianco et al., 2002).

A monodesiodação do T4 é caracterizada pela retirada do átomo de iodo do anel externo (fenólico) ou interno (tirosílico). Por causa da rotação do anel fenólico nas moléculas de iodotironinas, as monodesiodações nas posições 3' ou 5' do anel fenólico são equivalentes e origina o T3, esta desiodação é conhecida como via bioativadora, pelo fato do T3 ser conhecido como hormônio biologicamente ativo; enquanto a monodesiodação nas posições 5 ou 3 do anel tirosílico é considerada como via bioinativadora pois origina rT3 e 3,3'-T2 a partir de T4 e T3, respectivamente, hormônios não tem clara descrição de sua atividade biológica (Köhrle, 1999; Bianco *et al.*, 2002).

Baseado em vários fatores, como análise da cinética e padrão de inibição por certas substâncias, como o 6n-propil-2-tiouracil (PTU), duas enzimas com atividade 5' desiodase (desiodação do anel externo) foram identificadas, as desiodases tipo 1 e tipo 2 (D1 e D2, respectivamente). A D1 também catalisa a desiodação do anel interno (tirosílico) das iodotironinas, principalmente quando sulfatadas. Uma terceira enzima também foi identificada, a desiodase tipo 3 (D3), que catalisa a desiodação no anel interno de T4 e T3, produzindo rT3 e 3,3'- e -T2, respectivamente (Bianco *et al.*, 2002) (Figura 4).



**Figura 4.** Representação esquemática da cascata de desiodação das iodotironinas. Vias de ativação ou inativação das iodotironinas pelas enzimas desiodases tipo 1 (D1), 2 (D2) e 3 (D3). Adaptado de Leonard & Visser, 1986 e Bianco *et al.*, 2002.

A presença de receptores de HT em praticamente todos os tecidos do organismo ressalta seu papel vital na função celular, sendo bem descritos seus efeitos no metabolismo de lipídeos, proteínas, carboidratos, no sistema simpático e cardíaco, no músculo esquelético, no tecido ósseo, na hematopoiese, no sistema endócrino, no crescimento e desenvolvimento e na termogênese (Bianco *et al.*, 2002).

## 2.7 Desiodase Tipo 2

A iodotironina desiodase tipo 2 (D2) converte T4 à T3 pela desiodação do anel externo. Em ratos, a atividade D2 é encontrada predominantemente em hipófise, cérebro e tecido adiposo marrom (TAM); também é expressa em gônadas, útero gravídico ou não, glândula pineal e timo de rato, e na glândula mamária de camundongo (Germain e Galton, 2005; Galton *et al.*, 2001; Bianco *et al.*, 2002). Em humanos, a atividade D2 também foi identificada na tireoide, no cérebro fetal e de adulto, na artéria coronária, no coração, na medula espinhal e na placenta, além de em quantidade menor no rim, pâncreas e no músculo esquelético (Tanaka *et al.*, 1986; Croteau *et al.*, 1996; Salvatore *et al.*, 1996; Bianco *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2009).

A localização celular da D2 é uma característica importante desta enzima, estudos demonstram que a porção NH<sub>2</sub> terminal da D2 está no lúmen do retículo endoplasmático, enquanto o terminal COOH (sítio ativo) está no citosol, assim, sua posição determina sua função de geração do T3 intracelular (Gereben *et al.*, 2008).

Muitos estudos relatam que a D2 é a principal fonte local de T3 no TAM, sendo essencial na adaptação da termogênese em ratos expostos ao frio (Bianco. e Silva, 1987; Carvalho *et al.*, 1991). Além disso, Jesus *et al.*, (2001) demonstraram que animais *knokout* para D2 expostos ao frio apresentam hipotermia, e apenas sobrevivem devido a um aumento dos tremores e uma perda aguda do peso corporal, apesar dos níveis séricos normais de T3.

As diferenças específicas na expressão da D2 entre as espécies indicam que esta enzima tem funções espécie-específica (Bianco *et al.*, 2002). Parecia ser um consenso que a principal contribuição fisiológica da D2 era originar o T3 intracelular, mas Hosoi *et al.* (1999) demonstraram expressão e atividade D2 no músculo esquelético humano, sugerindo que a D2 poderia ser, também, uma fonte para a produção de T3 plasmático em humanos. Esta hipótese foi confirmada por Maia *et al.* (2005) os quais sugerem que a D2 seria a principal fonte extratireoidea de T3 em humanos eutireoideos. Em contrapartida, Schneider *et al.* (2001)

observaram, em animais *knockout* para D2, T4 e TSH séricos elevados, mas T3 sérico normal, mostrando que, pelo menos em camundongos, a D2 não seria a principal fonte de T3 plasmático.

Na maioria dos tecidos em que é expressa, a D2 é regulada negativamente pelos HT, sendo o T4 e o rT3 inibidores mais potentes que o T3, o que mostra não ser a diminuição na atividade da D2 mediada via receptor de T3 nuclear (Leonard & Visser, 1986).

A regulação da atividade da D2 é considerada um mecanismo crítico para manutenção de suas funções fisiológicas, sua propriedade bioquímica de possuir uma meia vida curta (40 minutos) é decisiva para manutenção de suas funções homeostáticas (Gereben et al., 2008). A exposição rápida ao frio promove ativação simpática que leva a liberação de catecolaminas na circulação ativando regiões hipotalâmicas. O TAM é um tecido intensamente innervado pelo sistema nervoso simpático, e o aumento da atividade simpática é capaz de aumentar a atividade da D2 neste tecido em cerca de 50% (Bianco et al., 2005).

A atividade da D2 também é modulada pelas alterações no níveis séricos de corticosterona, no entanto os dados ainda são muito controversos. O aumento dos níveis séricos da corticosterona tem demonstrado aumentar a atividade da D2 no BAT de ratos estressados (Olivares et al., 2012), outros trabalhos demonstram um efeito inibitório dos glicocorticóides na ativação do HT pela conversão periférica do T4 a T3 (Kakucksa et al., 2005; Bianco et al., 1987), além disso estudos “*in vitro*” sugerem que s glicocorticoides podem estimular o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide através do aumento da síntese e secreção de TSH, (Ahlquist et al., 1989) aumentando a expressão da D2 (Kim et al., 1998) ou aumentando a atividade desta enzima (Courtin et al., 1989)

## **2.8 Privação de Sono e o Sistema Endócrino**

Historicamente, o tempo de sono ocupou um terço de nossas vidas, no entanto, atualmente, o período de sono tem-se reduzido em função das atividades contemporâneas, em consequência do cenário econômico, que o homem é induzido a prolongar a jornada de trabalho, além disso, a exposição à luz artificial permitiu o aumento do período das atividades de trabalho, estudo e lazer, prolongando o período da vigília. Essas questões socioeconômicas e culturais conduzem a uma redução significativa do tempo de sono (Alvarega, 2008).

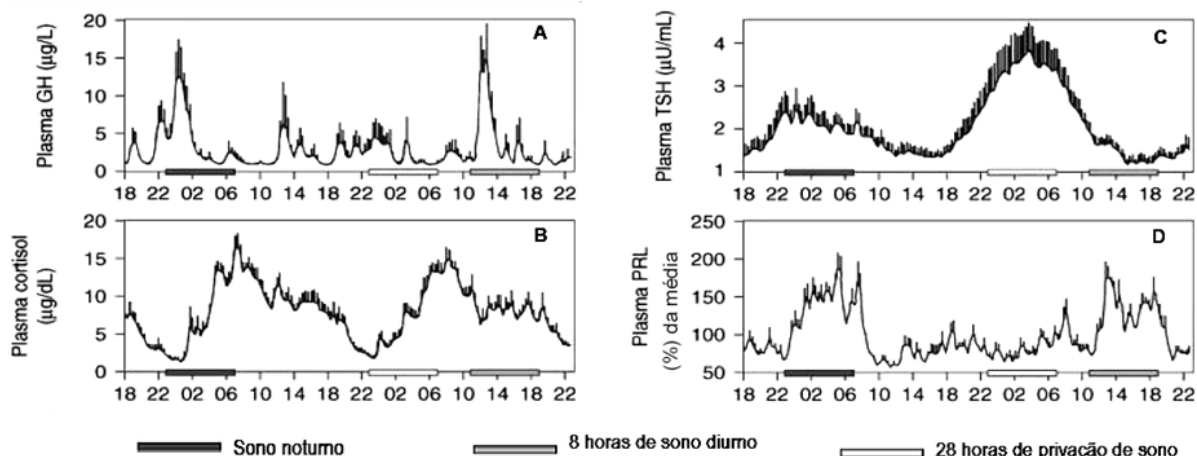
A privação de sono é uma preocupação social relevante devido às importantes implicações no desempenho individual e na saúde. Já foram descritas alterações hormonais e

neuroquímicas (Tasali *et al.*, 2008), por exemplo, Spigel *et al.* (1999) relataram aumento das concentrações de cortisol e da atividade simpática, além de maiores concentrações de marcadores inflamatórios em homens jovens restritos de sono 4 horas por noite, durante seis noites.

A privação de sono em homens e animais provoca diversas alterações como diminuição do desempenho psicomotor e cognitivo, variação de humor, disfunções metabólicas, alterações em parâmetros comportamentais (Vogel, 1975; Suchecki *et al.*, 2003; Silva, 2004; Frussa-Filho, 2004; Hipólido, 2005; Antunes, 2006; Araujo, 2006; Allard, 2007; Guzman-Martins, 2008; Tasali, 2008; Alvarenga *et al.*, 2008), além de seu efeito antidepressivo, devido sua ação na modulação nos receptores serotoninérgicos em casos agudos de privação de sono (Giedke e Schwarzler, 2002).

A importância do sono paradoxal (sono REM) para o organismo pode ser observada pela normalização de alguns parâmetros endócrinos quando é realizada a recuperação do sono após a privação. Muitos autores acreditam que a perda de sono pode ser compensada pelo “sono intenso” em um período relativamente curto, este sono rebote é caracterizado pela recuperação dos processos e ciclos circadianos (Tufik *et al.*, 2009).

A Figura 5 ilustra o perfil dos hormônios GH, cortisol, TSH e prolactina analisados durante o sono noturno, período de 28 horas de privação de sono, e a recuperação no dia subsequente (8 horas de sono diurno) em voluntários jovens e saudáveis (Van Cauter, 1991; Van Cauter e Spiegel, 1999).



**Figura 5.** Perfil hormonal do hormônio do crescimento (GH), cortisol, hormônio tireoestimulante (TSH) e Prolactina (PRL) de 8 homens adultos jovens durante o sono noturno, 28 horas de privação de sono e 8 horas de sono diurno (modificado de Van Cauter et al., (1991); Van Cauter e Spiegel.,1999).

Em animais existem duas principais técnicas utilizadas para estudos sobre privação de sono, a metodologia dos discos giratórios (Baumgartner, 1986) que consiste em discos que fazem rotações impedindo que os animais durmam, nesta metodologia o comando da rotação da plataforma é determinado pela fase do sono ou pelo tempo total de sono de acordo com o protocolo experimental, esta metodologia os animais estão conectados com eletrodos acoplados a um sistema de registros eletroencefalográficos que ativam ou inativam a rotação da plataforma. Outra metodologia muito utilizada é a das plataformas múltiplas modificado (Nunes e Tufik, 1994) nesta metodologia apenas a fase REM do sono é privada, consiste em plataformas pequenas posta em tanques com água, quando os animais entram na fase REM do sono onde ocorre a atonia muscular, o focinho destes animais encosta na água e eles não conseguem ter a fase REM.

Os hormônios sexuais também sofrem influência da privação de sono, Andersen *et al.* (2003, 2004, 2005, 2006, 2007) demonstraram, em ratos machos adultos que os níveis séricos de testosterona e estradiol diminuíram e os níveis de progesterona aumentaram após 96 horas de privação de sono paradoxal, utilizando a metodologia das plataformas múltiplas.

Outras alterações no sistema endócrino decorrentes da privação de sono paradoxal (PSP) também têm sido demonstradas em ratos, como a diminuição da leptina e aumento da grelina após cinco dias de PSP pelo método do disco giratório (Everson e Crowley, 2004).

Outros estudos relataram que quatro dias de PSP, através da metodologia das plataformas múltiplas, foi capaz de promover aumento do hormônio adenocorticotrópico (ACTH) e de corticosterona (Andersen *et al.*, 2003, 2004, 2005; Zager *et al.*, 2007). Entretanto, Suchecki *et al.* (2002) demonstraram que a restrição de sono por 14 e 21 dias não altera os níveis de corticosterona.

Em ratos, a corticosterona foi aumentada pela PSP, provavelmente como consequência do aumento ao ACTH, e a corticosterona em maiores concentrações, pode ser responsável pela diminuição da produção de testosterona pelas células de leydig (Gao *et al.*, 2002).

Everson e Crowley (2004) demonstraram, em ratos, pela metodologia das plataformas múltiplas, que as concentrações séricas de GH, IGF-1 e prolactina diminuíram após 15 dias de privação parcial ou total de sono.

Seabra *et al.* (1993) demonstraram hipertermia, em ratos, após 4 dias de PSP, através do modelo de plataformas múltiplas modificado. A PSP leva ao aumento de noradrenalina tanto na corrente sanguínea quanto no cérebro, este aumento estimula a atividade da Na-K ATPase, aumentando a taxa metabólica, o que pode causar o aumento da temperatura corpórea (Manoj *et al.*, 2008). No entanto, Everson e Crowley (2004) demonstraram em ratos privados de sono total, que após 3 semanas os animais apresentam hipotermia e aumento da morbidade, pela metodologia do disco giratório.

## **2.9 Privação de Sono e Hormônios Tireóideos**

Poucos trabalhos estudaram a influência da privação de sono sobre a função tireoideia. Balzano *et al.* (1990) e Everson *et al.* (1995) demonstraram diminuição dos níveis séricos de T4 e aumento da atividade da D2 no tecido adiposo marrom de ratos privados de 58% e 90% de sono total pela metodologia das plataformas giratórias, enquanto apenas Everson *et al.* (1995) observaram uma diminuição dos níveis séricos do T3. Posteriormente, Everson *et al.* (2001) demonstraram que a privação do tempo total de sono usando a metodologia da plataforma giratória, leva a uma hipotiroxinemia e aumento da expressão do TRH, porém apesar da maior expressão do TRH, o TSH não sofreu alteração, porém nesse estudo não foi analisado o metabolismo periférico dos HT.

Como descrito anteriormente, a privação de sono paradoxal em ratos causa alterações dos níveis de corticosterona, hormônios gonadais e causa hipertermia entre outras alterações fisiológicas. Muitos trabalhos sugerem que a função tireoideia é influenciada por outros eixos



endócrinos (Bianco *et al* 2002), no entanto, a influência da privação de sono paradoxal e da restrição de sono sobre a função tireoidea, e os possíveis mecanismos para tal modulação, ainda não foram esclarecidos.

**OBJETIVO**

## **3 OBJETIVO**

### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da privação de sono paradoxal por 24 e 96 horas e da restrição de sono por 21 dias, bem como a modulação do período de sono rebote sobre a função tireoidea e atividade da iodotironina desiodase tipo 2 em ratos.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as concentrações séricas de T3, T4, TSH e corticosterona; quantificar a atividade da enzima iodotironina desiodase tipo 2 na hipófise e no tecido adiposo marrom.
- Analisar a função *in vivo* do co-transportador sódio-iodeto (NIS) na glândula tireoide.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Ratos Wistar, machos (200-250g) do biotério da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), foram mantidos em ciclo de claro escuro de 12 h (7 às 19h – período claro) e temperatura controlada 22°C, com comida e água *ad libitum*. Todo o protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética e bem estar animal da UFRRJ, processo N°. 23083.006390/2010-34.

### 4.2 Protocolo de privação / restrição de sono

O protocolo usado para a privação de sono paradoxal (PSP) e restrição de sono (RS) foi baseado na metodologia das plataformas múltiplas modificada (Nunes e Tufik, 1994). Para a PSP foram utilizadas 10 plataformas circulares (6,5 cm de diâmetro), com 1 cm acima da superfície em um tanque de 57 × 48 × 21-cm cheio de água (Figura 6). Os ratos foram colocados nas plataformas (5 ratos por tanque) e eles podiam se mover pulando de uma plataforma para outra. Quando eles atingiam a fase paradoxal do sono, eles caíam na água devido à atonia muscular, sendo acordados. Para a RS, os animais foram retirados dos tanques às 10h, sendo permitido dormir até às 16h, quando eles foram novamente colocados nos tanques, assim esses ratos puderam dormir 6 horas por dia.

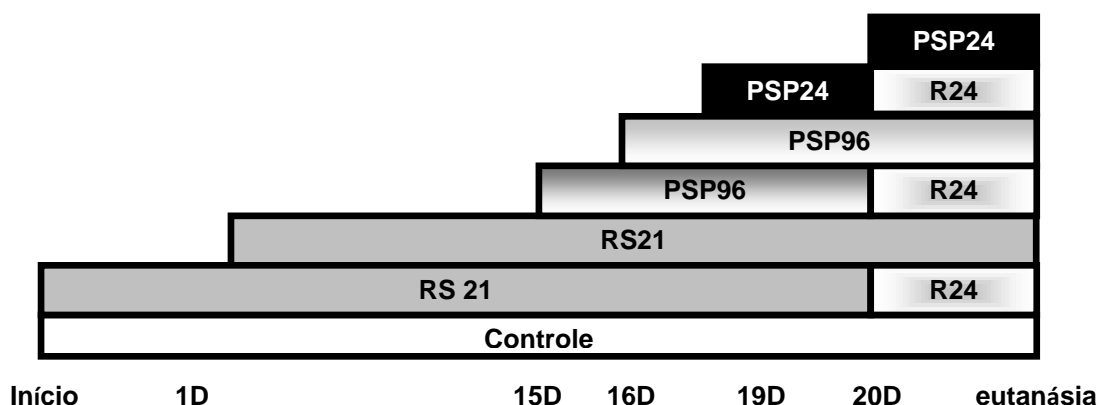


**Figura 6.** Foto representativa da metodologia das plataformas múltiplas modificado (Nunes e Tufik, 1994. Fonte: Alvarenga, 2008).

### 4.3 Protocolo experimental

Uma semana antes do início do experimento os animais foram mantidos na sala de privação / restrição de sono, sendo colocados por uma hora nos tanques de privação de sono para adaptação nos três dias que precederam o início do experimento.

Os ratos foram randomicamente distribuídos em 7 grupos: 1- Controle (C, n=10), mantido na sala de experimento, com padrão de sono normal; 2- Privados de sono paradoxal por 24 horas (PSP24, n=15); 3- PSP24 com sono rebote de 24h (PSP24R, n=12), com o protocolo igual ao PSP24, porém podendo dormir livremente por 24 horas no ultimo dia; 4- Privados de sono paradoxal por 96h (PSP96, n=13), os animais são privados de sono paradoxal durante 96 horas; 5- PSP96 com sono rebote de 24h (PSP96R, n=14), com o mesmo protocolo do PSP96, podendo dormir livremente no 5° dia; 6- Restrito de sono por 21 dias (RS21, n=14): esses animais são restritos de sono por 18h/dia durante 21 dias, sendo retirados dos tanques de privação às 10h e recolocados às 16h; e 7- RS21 com sono rebote de 24h (RS21R, n=15), com protocolo igual ao RS21, porém no 22° dia não são submetidos a restrição de sono paradoxal (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema temporal (D, dias) representativo dos grupos experimentais. Controle, restritos de sono paradoxal por 21 dias (RS21) e restritos de sono 21 dias com sono rebote de 24h (RS21R), privados de sono paradoxal por 96h (PSP96) ou 24h (PSP24) e estes com sono rebote de 24h (PSP96R e PSP24R, respectivamente).

Para avaliarmos a função do co-transportador sódio/iodeto (NIS) na privação de sono paradoxal seletiva, injetamos uma solução radioativa nos animais, dessa forma, um experimento foi realizado apenas para esta avaliação, então ratos machos foram distribuídos em 5 grupos: C (n=8), PSP24 (n=8), PSP24R (n=8), PSP96 (n=8) e PSP96R (n=8), ao final do experimento os animais foram eutanasiados e a glândula tireoide foi excisada e pesada em balança digital (*Bel engineering*).

#### 4.4 Procedimentos gerais e coleta tecidual

O peso corporal de todos os animais foi verificado no início e ao final do experimento, dessa forma calculamos o ganho de peso corporal (peso final menos peso inicial, em gramas) de cada grupo experimental.

Todos os grupos experimentais foram eutanasiados no mesmo dia. O sangue foi coletado e centrifugado (3000 rpm por 20 minutos) para a obtenção do soro. O soro foi estocado à -20°C para análise de T3, T4, TSH e corticosterona totais. A glândula tireoide foi excisada e pesada em balança digital (*Bel engineering*), sendo determinado o peso absoluto (g) e o peso relativo (peso da tireoide /peso corporal, mg/g). Hipófise e tecido adiposo marrom foram retirados e estocados à -70°C para posterior análise da atividade da enzima desidase tipo 2.

#### **4.5 Dosagens séricas de corticosterona**

Os níveis séricos de corticosterona foram analisados através da técnica de Radioimunoensaio (RIE) com Kit específico (*Corticosterone. MP Biomedicals, LLC 13485*). Todo procedimento foi realizado de acordo com as especificações do Kit. A corticosterone sérica foi expressa em ng/mL.

#### **4.6 Dosagens séricas de T3 e T4**

Os níveis séricos de T3 e T4 totais foram analisados pela técnica de Eletroquimioluminescência, com equipamento e reativos da Roche Diagnóstica, realizado no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia (LACFAR) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo o T3 expresso em ng/dL e o T4 em µg/dL.

#### **4.7 Dosagem sérica de TSH**

As dosagens séricas de TSH foram feitas por RIE específico, empregando um kit fornecido pelo *National Institute of Diabetes and Kidney Diseases* (NIDDK-Bethesda, EUA). Este *kit* é composto por TSH murino purificado para a preparação das amostras utilizadas na curva padrão (0,625 a 25 ng/ml), TSH murino purificado para ser iodado e o anticorpo de coelho anti-TSH murino (1º Ac). A iodação da molécula de TSH com <sup>125</sup>I foi realizada pelo método da cloramina T, conforme previamente descrito (Ortiga, 1992), no Laboratório de Endocrinologia Molecular e gentilmente cedido pela professora Carmem Cabanelas Pazos Moura, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O RIE foi realizado pelo método do 2º anticorpo, o qual foi gentilmente cedido pelo professor José Antunes Rodrigues da Universidade de São Paulo –Ribeirão Preto, sendo adicionado 6% de polietilenoglicol. O TSH sérico foi expresso em ng/dL.



#### 4.8 Atividade da desidase tipo 2 (D2)

A glândula hipófise ou 40 mg de tecido adiposo marrom (TAM) foram homogeneizados em tampão fosfato contendo 1nM EDTA, 0.25M sucrose e 10mM de DTT (pH 6.9) em gelo através de ultraturrax, os homogeneizados foram armazenados a -70°C até o dia do ensaio. Alíquotas de 20 µl foram guardadas separadamente a -20°C para dosagem de proteínas (ptn) pelo método de Bradford (1976).

O traçador radioativo foi purificado em virtude das desidases espontâneas das iodotironinas marcadas, mesmo na ausência da enzima. Para a purificação, foi utilizada uma coluna de 2ml de Sephadex L20 (Amersham Biosciences) (4 ml de H<sub>2</sub>O/g de gel seco) para se obter somente o <sup>125</sup>I-T4 radioativo presente na solução, com atividade específica de 1210 µCi/µg (44,8 MBq/µg) (Perkin Elmer Life Sciences, Inc., Boston, MA). Uma alíquota de 70 µl do T4 marcado foi diluída em 12 ml de H<sub>2</sub>O destilada e aplicada à coluna, seguindo uma lavagem com 6 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Os eluatos contendo radioiodeto foram desprezados e o T4 marcado foi eluído com 4,5 ml de etanol 70%. O eluato de etanol 70% contendo a iodotironina foi colhido em nove tubos de vidro, de onde foram retirados 5 µl para contagem da radiação gama no contador Wizard (2470 Wallac Wizard<sup>TM</sup> automatic gamma counter). Os tubos com mais de 5.000 cpm/5 µl foram reunidos e guardados a 4°C, ao abrigo da luz, até o dia seguinte, quando foi realizado o ensaio.

O homogeneizado contendo 15 µg para hipófise ou 50 µg para o TAM foi incubado em duplicata, por 3 horas a 37°C com 1nM de <sup>125</sup>I-T4, 1mM de PTU e 20 mM de DTT em 100 mM tampão fosfato contendo 1mM de EDTA, em volume final de 300 µl, como descrito previamente (Berry *et al* 1991, Fortunato *et al.* 2006). Decorrido o tempo de incubação, a reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 200 µl de soro fetal bovino (Cultilab, BR) gelado e 100 µl de ácido tri-cloro acético (TCA) 50% para a precipitação das proteínas. Os tubos foram agitados vigorosamente no *vortex* durante 2 minutos e centrifugados (10000 rpm por 3 minutos, microcentrífuga). Por fim, 360 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos de contagem e a detecção da radiação foi realizada em cintilador de fase sólida Wizard (2470 Wallac Wizard<sup>TM</sup> automatic gamma counter). A atividade da enzima desidase tipo 2 foi expressa em fmoles T4/min.mg ptn.

#### **4.9 Função do co-transportador sódio/iodeto (NIS)**

A determinação da função do co-transportador sódio/iodeto (NIS) foi realizado como previamente descrito por Lima *et al.* (2006). Para avaliar a atividade do NIS *in vivo* usando a medição da captação de radioiodo pela tireoide, sem a influência da reação de organificação do iodo realizado pela atividade da TPO, os animais receberam 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na-}^{125}\text{I}$  (250.000 dpm) e após 15 minutos da administração intraperitoneal os animais foram eutanasiados, a glândula tireoide foi removida, pesada e levada para contagem em cintilador de fase sólida Wizard (2470 Wallac Wizard<sup>TM</sup> automatic gamma counter). A atividade do NIS foi expressa em porcentagem do total de  $^{125}\text{I}$  injetado por mg de tireoide.

#### **4.10 Análise estatística**

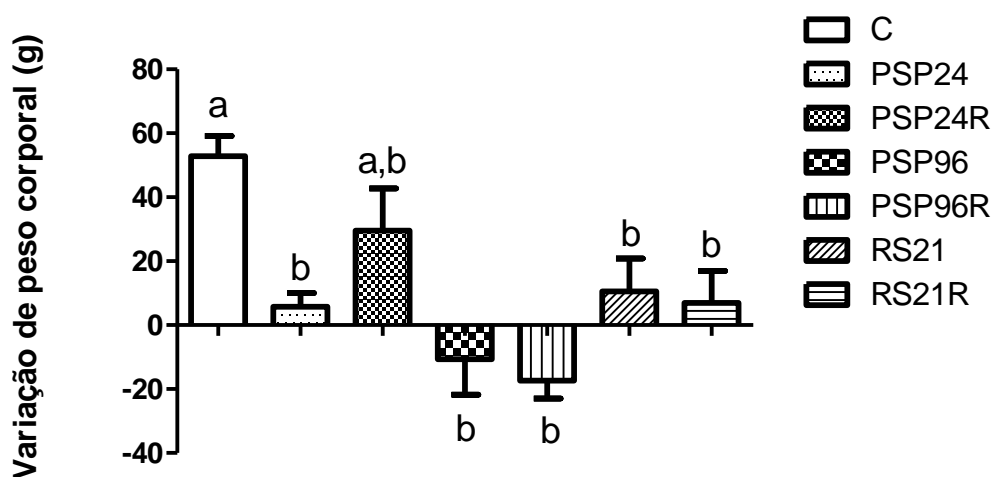
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística empregada na comparação dos resultados foi realizada com a utilização do programa de análises estatísticas Graphpad Prism (Graphpad Software, Inc., San Diego, USA), sendo analisado por análise de variância univariada paramétrica, seguido de teste de comparação múltipla de Bonferroni. Os dados de TSH sérico foram analisados por variância univariada não paramétrica, *Kruskal-Wallis*, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Variação do peso corporal

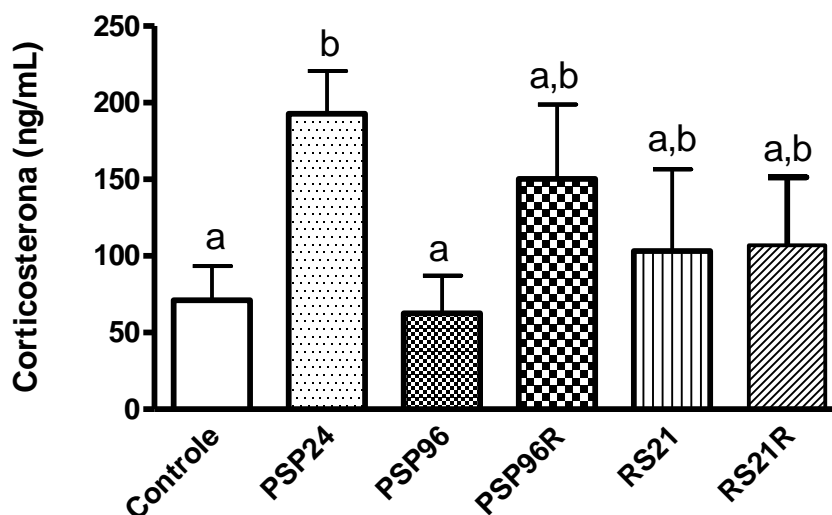
Os animais apresentaram uma diminuição significativa no ganho de peso corporal após privação de sono por 24h, 96h e 96h com rebote de 24h (PSP24,  $5,71 \pm 4,31g$ ; PSP96,  $-10,62 \pm 11,09g$ ; PSP96R,  $-17,33 \pm 5,62g$ , respectivamente). O período de sono rebote apenas normalizou o ganho de peso corporal após 24 horas de privação de sono (PSP24R,  $29,5 \pm 13,22g$ ), a restrição de sono por 21 dias e esta com rebote também diminuiu significativamente o ganho de peso corporal destes animais (RS21,  $10,54 \pm 10,28g$ ; RS21R,  $6,93 \pm 10,01g$ ) em relação ao grupo controle (C,  $52,80 \pm 6,31g$ ), como mostra a Figura 8.



**Figura 8.** Variação de peso corporal dos animais nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 24 horas com período de rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período de rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de rebote por 24 horas (RS21R) n = 13 por grupo. Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

## 5.2 Níveis séricos de corticosterona

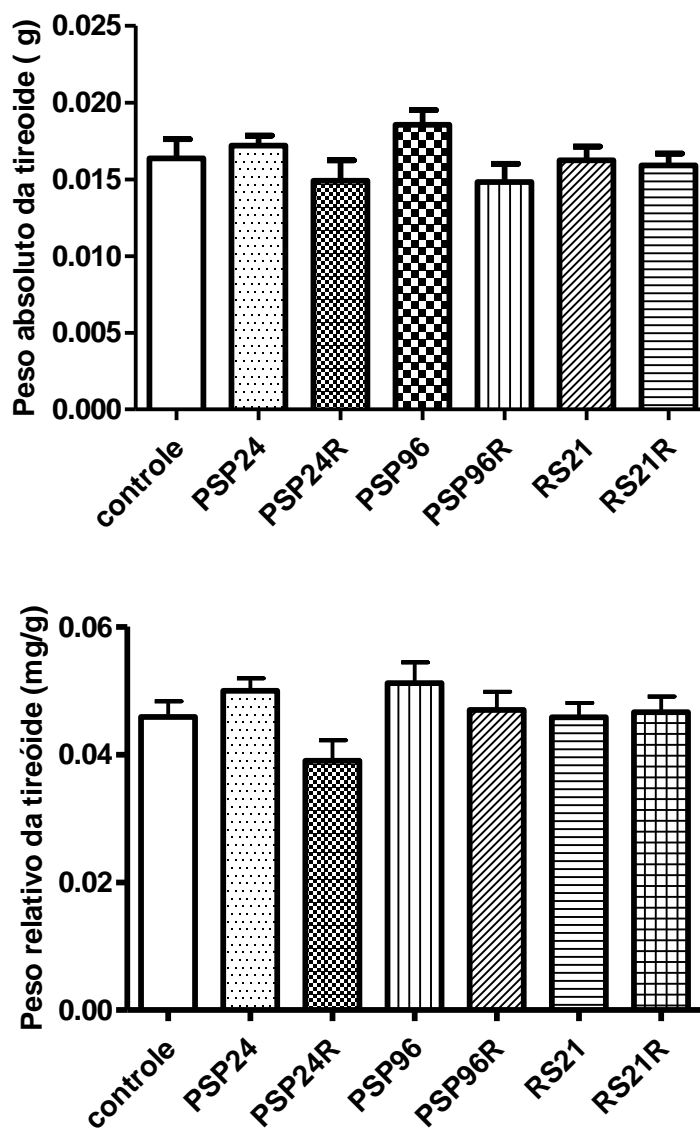
Os níveis séricos de corticosterona foram analisados em ratos controles (C, n=5), privados de sono paradoxal por 24h (PSP24, n=5) ou 96h (PSP96, n=3), PSP por 96h com sono rebote de 24h (PSP96R, n=5), restritos de sono por 21 dias (RS21, n=3) e estes com rebote (RS21R, n=3). A corticosterona sérica aumentou significativamente apenas no grupo de privação de sono paradoxal por 24h ( $192,8 \pm 27,82$  ng/mL) em relação ao grupo controle ( $71,15 \pm 22,29$  ng/mL), não havendo diferenças significativas entre os grupos C, PSP96, PSP96R, RS21 e RS21R (Figura 9).



**Figura 9.** Níveis séricos de corticosterona nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período rebote por 24 horas (RS21R) n = 5 por grupo. Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Peso da Tireoide

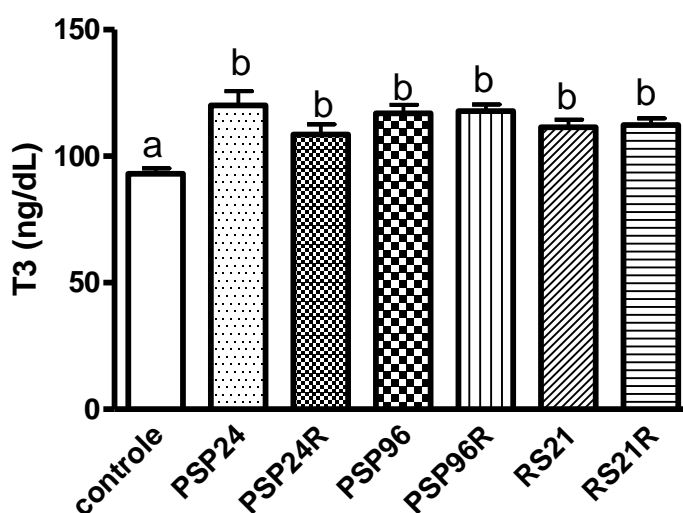
Tanto o peso relativo quanto o peso absoluto da glândula tireoide não foram significativamente diferentes entre os grupos de PSP e de RS em relação ao grupo controle (Figura10).



**Figura 10.** Peso absoluto da tireoide (A) e o peso relativo da tireoide (B) (peso da tireoide em mg/peso do animal em g) nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), PSP24 com período rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), PSP96 com período rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e RS21 com período rebote de 24 horas (RS21R)n = 13 por grupo.

## 5.4 Dosagem sérica de T3

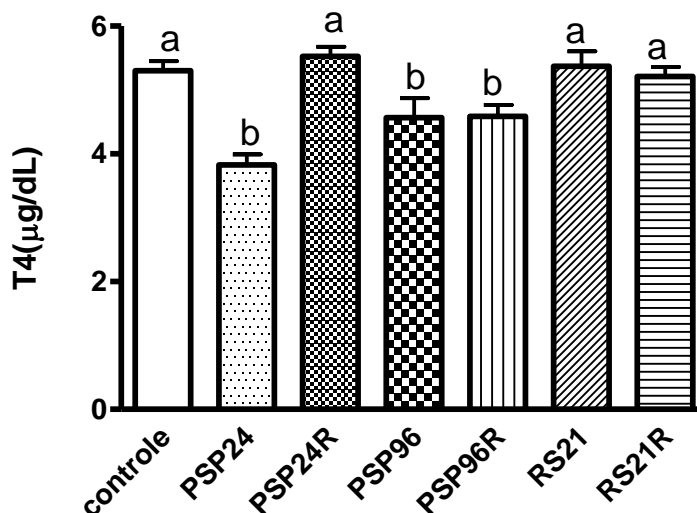
O T3 sérico aumentou significativamente tanto nos grupos privados de sono por 24 ou 96 horas (PSP24,  $120.1 \pm 5.642$ ; PSP96  $116.9 \pm 3.407$  ng/dl) quanto no grupo restrito de sono por 21 dias (RS21,  $111,5 \pm 2,93$  ng/dl) em relação ao grupo controle ( $93,00 \pm 2,16$  ng/dl). O período de sono rebote não foi capaz de normalizar essa diminuição, assim, os grupos que tiveram período rebote apresentaram T3 sérico significativamente maior (PSP24R,  $108.6 \pm 3,98$ ; PSP96R,  $117,8 \pm 2,66$ ; RS21R,  $112,4 \pm 2,52$  ng/dl) que o controle (Figura 11).



**Figura 11.** Níveis séricos de T3 nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 24 horas com período de rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período de rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de rebote por 24 horas (RS21R)  $n = 13$  por grupo . Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si.

## 5.5 Dosagem sérica de T4

O T4 sérico diminuiu significativamente na privação de sono paradoxal tanto de 24 horas ( $3,82 \pm 0,15 \mu\text{g/dl}$ ) quanto na de 96 horas ( $4,56 \pm 0,31 \mu\text{g/dl}$ ) e o período de sono rebote somente normalizou os valores de T4 na privação de sono de 24 horas (PSP24R,  $5,53 \pm 0,15 \mu\text{g/dl}$ ), permanecendo o T4 diminuído no grupo PSP96 com sono rebote (PSP96R,  $4,59 \pm 0,18 \mu\text{g/dl}$ ), todos em relação ao grupo controle ( $5,30 \pm 0,15 \mu\text{g/dl}$ ). Em contrapartida, a restrição de sono por 21 dias (grupo RS21) e o sono rebote após esse tempo de restrição (RS21R), não alterou os níveis séricos de T4 (Figura 12).

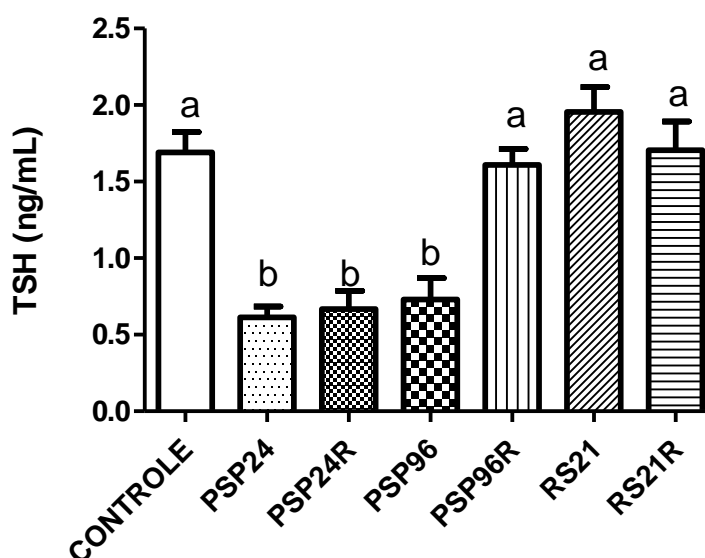


**Figura 12.** Níveis séricos de T4 nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 24 horas com período de sono rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de sono rebote por 24 horas (RS21R) n = 13 por grupo. Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si.



## 5.6 Dosagem sérica de TSH

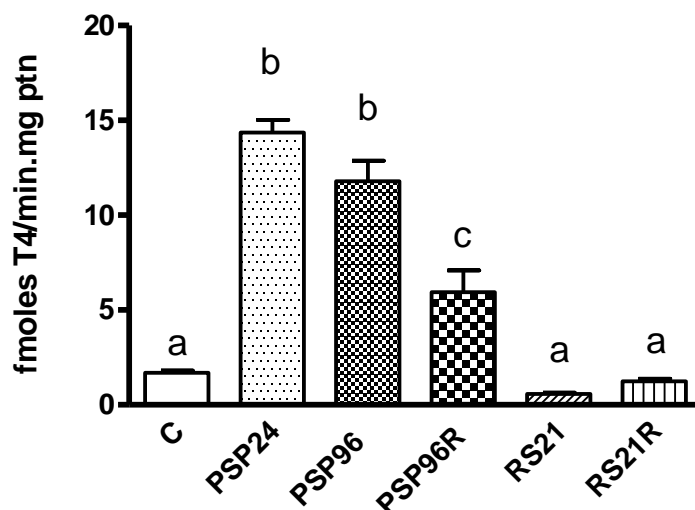
Os níveis séricos de TSH diminuíram significativamente na privação de sono paradoxal de 24 horas (PSP24,  $0,61 \pm 0,07$  ng/dl), na privação de sono paradoxal por 24 horas com rebote (PSP24R,  $0,67 \pm 0,12$  ng/dl) e na privação de sono paradoxal de 96 horas (PSP96,  $0,73 \pm 0,14$  ng/dl) comparados ao grupo controle ( $1,69 \pm 0,13$  ng/dl). O período de sono rebote somente normalizou essa diminuição na privação de sono paradoxal de 96 horas (PSP96R,  $1,61 \pm 0,10$ ). O TSH sérico dos animais restritos de sono por 21 dias e estes com período rebote não foi significativamente diferente (RS21,  $1,95 \pm 0,16$  e RS21R,  $1,70 \pm 0,19$  ng/dl) do grupo controle (Figura 13).



**Figura 13.** Níveis séricos de TSH nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 24 horas com período de rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período de rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de rebote por 24 horas (RS21R) n = 13 por grupo. Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si.

## 5.7 Desiodase tipo 2 no tecido adiposo marrom

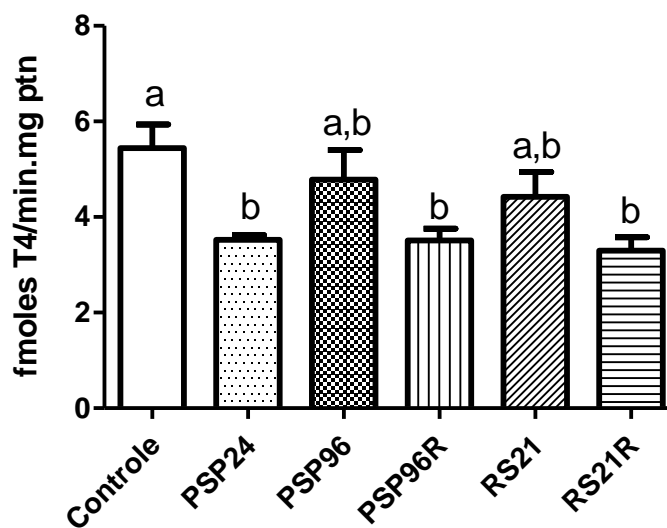
A atividade da D2 no tecido adiposo marrom (TAM) foi analisada em ratos controles (C, n=6), privados de sono paradoxal por 24h (PSP24, n=10) ou 96h (PSP96, n=5), PSP por 96h com sono rebote de 24h (PSP96R, n=5), restritos de sono por 21 dias (RS21, n=5) e estes com rebote (RS21R, n=5). A atividade D2 aumentou significativamente no TAM dos animais privados de sono paradoxal por 24 ou 96 horas (PSP24,  $14,35 \pm 2,12$ ; PSP96,  $11,79 \pm 2,41$  ; PSP24  $14,35 \pm 2,12$  fmoles T4/min.mg ptn) em relação ao controle ( $1,69 \pm 0,29$  fmoles T4/min.mg ptn), como mostra a Figura 14.



**Figura 14.** Atividade da desiodase tipo 2 (D2) no tecido adiposo marrom (TAM) dos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas, com período de rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de rebote por 24 horas (RS21R) n = 5 por grupo. Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si.

## 5.8 Desiodase tipo 2 na hipófise

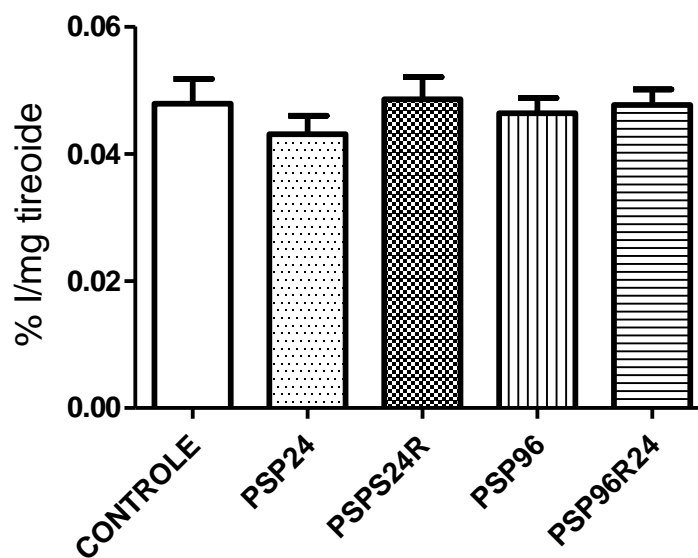
A atividade da D2 na hipófise foi analisada em ratos controles (C, n=5), privados de sono paradoxal por 24h (PSP24, n=10) ou 96h (PSP96, n=5), PSP por 96h com sono rebote de 24h (PSP96R, n=5), restritos de sono por 21 dias (RS21, n=5) e estes com rebote (RS21R, n=5). A atividade D2 na hipófise diminuiu significativamente no grupo de privação de sono por 24 horas (PSP24,  $3,55 \pm 0,13$  fmoles T4/min.mg ptn) em relação ao grupo controle ( $5,44 \pm 0,56$  fmoles T4/min.mg ptn), não havendo alteração quando a privação era feita por 96 horas ou quando os ratos eram restritos de sono por 21 dias. Entretanto, o sono rebote de 24 horas levou a um aumento significativo da atividade da desiodase tipo 2 no TAM, tanto após privação de sono por 96 horas (PSP96R,  $3,51 \pm 0,28$  fmoles T4/min.mg ptn) quanto após a restrição de sono por 21 dias (RS21R,  $3,30 \pm 0,28$  fmoles T4/min.mg ptn) comparados ao grupo controle (Figura 15).



**Figura 15.** Gráfico mostrando a atividade da D2 na hipófise nos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas, com período de rebote de 24 horas (PSP96R), restritos de sono por 21 dias (RS21) e restritos de sono por 21 dias com período de rebote por 24 horas (RS21R) n = 5 por grupo. Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si.

## 5.9 Função do co-transportador sódio/iodeto

A atividade do co-transportador sódio/iodeto foi avaliada na tireoide de ratos controles (n=8), privados de sono paradoxal por 24 (PSP24, n=8) ou 96 horas (PSP96, n=8), privados de sono submetidos ao período de sono rebote de 24 horas (PSP24R, n=8 e PSP96R, n=8). Não houve diferença significativa na atividade do co-transportador sódio/iodeto entre os grupos estudados (Figura 16).



**Figura 16.** Atividade do co-transportador sódio/iodeto na tireoide dos grupos: Controle, privado de sono paradoxal por 24 horas (PSP24), privado de sono paradoxal por 24 horas com período de rebote de 24 horas (PSP24R), privado de sono paradoxal por 96 horas (PSP96), privado de sono paradoxal por 96 horas com período de rebote de 24 horas (PSP96R) n = 8 por grupo.

Muitos trabalhos relatam modulação da função tireoidea após diversos tipos de fatores estressores crônicos e agudos, tais estudos tentam entender melhor o funcionamento do mecanismo de *feedback* negativo, responsável pela regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (Olivares *et al.*,2011). Os hormônios tireoideos são classicamente conhecidos por exercer um papel importante no crescimento, diferenciação e metabolismo, dessa forma, alterações nas suas concentrações tem sido relacionadas com doenças psiquiátricas e distúrbios do comportamento sexual (Helmreich *et al.*, 2005). Alguns estudos demonstram que tanto o fator estressor, quanto duração, se relacionam com alterações da função tireoidea, no entanto estes estudos não são conclusivos, por exemplo, Takanuve *et al.* (1994) demonstraram que estresse por choque leva à diminuição dos níveis séricos dos hormônios tireóideos, por outro lado este mesmo protocolo causou um aumento destes hormônios no trabalho de Cizza *et al.* (1996).

O estresse por privação de sono paradoxal é capaz de aumentar os níveis séricos de corticosterona (Andersen *et al.*, 2004, 2005; sucheki *et al.*, 2005), a influência da corticosterona na modulação da função tireoidea tem sido estudada extensivamente nos últimos anos, Kakucksa e Lechan (1995) demonstraram que a administração de glicocorticóides é capaz de inibir o eixo tireoideo a nível hipotalâmico e hipofisário, bem como inibir a conversão de T4 à T3 periféricamente (Bianco, *et al.*, 1987), controversamente, o aumento dos níveis de corticosterona leva à um aumento da atividade simpática, um dos principais fatores de aumento da atividade desidrase tipo 2 (D2), principal enzima ativadora do hormônio tireoideo, aumentando à conversão de T4 à T3 periféricamente (Gereben *et al.*, 2005).

O principal achado do nosso trabalho foi observar que a modulação da função tireoidea é diferente em casos agudos de privação de sono paradoxal e crônicos de restrição de sono. Poucos trabalhos avaliam a modulação da função tireoidea após estresse de privação de sono. Apenas um trabalho estuda a importância dos hormônios tireoideos utilizando a mesma metodologia que nós usamos para a privação de sono paradoxal, no entanto o enfoque do trabalho é diferente já que eles comparam ratos eutireoideos com ratos tireoidectomizados (Salin-Pascual *et al.*, 1997). Os trabalhos que observam a influência da privação de sono na função tireoidea utilizam uma metodologia diferente para a privação do sono e/ou é feita a privação do tempo total de sono (Bergman *et al.*,1987; Everson *et al.*,1994, Everson *et al.*, 2002, Everson *et al.*,2004; Balzano *et al.*, 1990).

Tem sido demonstrado que a privação de sono paradoxal bem como a restrição de sono aumenta a atividade simpática, conseqüentemente a taxa metabólica, seguido por uma diminuição do ganho de peso corporal (Sucheki, *et al* 2005). Nosso trabalho corrobora com esses dados, uma vez que observamos, em ratos machos, uma diminuição significativa no ganho de peso corporal tanto na privação de sono paradoxal quanto na restrição de sono. O período de sono rebote de 24 horas só foi capaz de normalizar o ganho de peso corporal após 24 horas de privação de sono, assim, apesar do T3 sérico elevado, parece que agudamente a atividade do sistema simpático é normalizada o que possibilita o ganho de peso normal.

Em nosso trabalho não observamos alterações do peso absoluto e relativo da glândula tireoidea, nem da função do co-transportador sódio/iodeto (NIS) na membrana basal, assim, apesar do TSH ser um potente estimulador de crescimento e proliferação da célula folicular e aumentar a captação de iodeto através deste transportador, a diminuição do TSH sérico que encontramos nos animais privados de sono por 24 ou 96 horas não foi capaz de afetar o peso glândula e nem a atividade do NIS.

Ao avaliarmos os níveis séricos dos hormônios tireoideos, detectamos uma diminuição significativa do T4 na privação de sono por 24 e 96 horas, o que pode ser uma consequência direta da menor concentração de TSH sérico encontrado nestes animais, não havendo alteração do T4 na restrição de sono por 21 dias, correlacionado também com níveis séricos normais de TSH. O período de sono rebote nestes grupos normalizou o T4 após 24 horas de privação de sono, como neste grupo o TSH sérico está diminuído, é provável que esta normalização ocorra por uma diminuição na conversão periférica T4 à T3, o que torna muito importante a análise da atividade da desidase tipo 1 e tipo 2 nestes animais. Nossos resultados em relação ao T4 corroboram com o trabalho de Everson *et al.* (2004) e Baumgartner *et al.* (1986), que também observaram uma diminuição dos níveis séricos do T4, no entanto, Everson *et al.* (2004) não encontraram alterações nos níveis de TSH.

Por outro lado, observamos T3 sérico aumentado na privação de sono por 24 e 96 horas, na restrição de sono por 21 dias e nos seus respectivos grupos com sono rebote; como o hormônio tireoideo regula positivamente a taxa metabólica basal, estimula a lipólise, e o seu excesso está associado ao aumento do catabolismo proteico, este aumento do T3 pode estar associado à diminuição no ganho de peso corporal que observamos no nosso trabalho, além disso, este aumento dos níveis séricos do T3 também pode estar associado a um possível aumento da atividade da desidases tipo 1 que é conhecida classicamente como a principal

enzima responsável pela geração do T3 plasmático (Gerebem *et al.*, 2005). Os dados relacionados a síntese e secreção do T3 ainda são bem controversos, Bergman *et al.*,(1987) e Everson *et al.* (2002) não observaram diferenças significativa nos níveis séricos de T3 enquanto Everson *et al.*,(1995) relataram uma diminuição dos níveis séricos deste hormônio, ambos os dados contradizem nossos resultados, uma vez que observamos o aumento do T3 tanto em casos agudos quanto crônicos de privação de sono, essas diferenças podem estar relacionadas a diferença na metodologia de privação de sono utilizada.

Sabe-se que a diminuição sérica de T4 leva ao aumento da expressão de receptores para TRH na adeno-hipófise, aumentando a secreção de TSH, e também diminui o aporte nuclear de T3, o que estimula a transcrição gênica de TSH e TRH, caracterizando o mecanismo de *feedback* negativo (Kimura, 2008), no entanto, em nosso trabalho a diminuição dos níveis de T4 na privação de sono não foi capaz de causar aumento do TSH sérico, pelo contrário, o TSH sérico diminuiu na privação de sono, e, diferentemente do que foi observado nos resultados de T4, o período de sono rebote só foi capaz de normalizar os valores de TSH na privação de sono de 96 horas. Esta falha no mecanismo de *feedback* negativo pode estar relacionada ao fato de que muitos tipos de estresse estimulam a transmissão adrenérgica (Chaouloff *et al.*, 1993) que pode aumentar a atividade da D2 no sistema nervoso central. Em nosso modelo de estresse, podemos extrapolar para uma possível modulação positiva da D2 no hipotálamo, dado já relatado por Fekete e Lechan (2007) no caso de infecção. Esse aumento da D2 causaria um hipertireoidismo local e consequente inibição dos neurônios TRH hipofisiotrópicos, essa seria uma possível explicação para a supressão do eixo hipotálamo-hipófise e tireoide encontrada em nosso estudo, mas também não podemos descartar uma possível ação supressora do eixo pelos glicocorticóides. Apesar de muitos trabalhos demonstrarem que na privação de sono os níveis de corticosterona estão aumentados (Andersen *et al.*, 2004, Sucheki *et al.*, 2005; Alvarenga *et al.*, 2008), na restrição de sono estes dados são controversos (Sucheki *et al.*, 2005). O aumento dos níveis de corticosterona que nós detectamos na privação de sono por 24 horas pode estar modulando negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, diminuindo o RNAm do TRH e, consequentemente, a liberação de TSH (Dana *et al.*, 2005), o que pode explicar o menor TSH sérico que encontramos nesses animais, além disso, no nosso trabalho, os níveis séricos normais de corticosterona nos ratos restritos de sono por 21 dias se correlaciona com o TSH também normal.

Estudos relacionando a produção periférica do T3 através da atividade das iodotironinas desidases, ainda são muito contraditórios. Balzano *et al.*, (1990), utilizando a metodologia das plataformas giratórias, analisaram a atividade da desidases tipo 2, e observaram o aumento desta atividade no tecido adiposo marrom (TAM), corroborando com nossos resultados, pois demonstramos o aumento da atividade da D2 neste tecido nos casos de privação de sono seletiva. O aumento desta atividade pode está associado ao aumento dos níveis séricos de corticosterona que ocorre após privação de sono paradoxal, como demonstrado por Hiplóide e Suchecki (2006) e confirmado por nós no grupo de privação de sono por 24 horas. O aumento dos níveis de corticosterona pode levar a um aumento da atividade simpática que é conhecida por ser uma via ativadora da atividade D2 no TAM (Bianco, 2005). Este aumento da atividade D2 no TAM de ratos privados de sono por 24 ou 96 horas pode contribuir para o maior T3 sérico detectado nesses animais.

Balzano *et al.* (1990), utilizando a metodologia dos discos giratórios de privação de sono total, não observaram diferenças significativas na atividade da D2 na hipófise, diferente do que foi observado em nosso trabalho, já que encontramos uma diminuição da atividade D2 hipofisária no grupo privado de sono por 24 horas, então, apesar da diminuição do T4, observamos diminuição da D2 na hipófise, explicado pelo seu papel no mecanismo de feedback negativo. Christoffolette *et al.* (2006) demonstraram, usando uma linhagem de célula tumoral de camundongo T $\alpha$ T1, que a taxa absoluta de perda de atividade da D2 induzida por T4 é compensado pelo efeito combinado de reativação e uma alta taxa de síntese de D2, como resultado, um aumento no T4 rapidamente causa aumento na produção de T3 mediada pela D2 hipofisária e supressão da expressão do gene TSH $\beta$ , explicando o mecanismo de *feedback* do TSH mediado por T4. Assim, a produção de T3 mediada por D2 hipofisária é baixa em concentrações baixas de T4 e alta em altas concentrações do T4. A restrição de sono por 21 dias não foi capaz de alterar a atividade da D2 na hipófise, que pode ser relacionado ao T4 normal nesses animais; no entanto, o período de sono rebote destes grupos foi capaz de diminuir esta atividade, o que diminuiria o aporte nuclear de T3, estimulando a transcrição gênica de TSH, sugestivo de um mecanismo compensatório durante o rebote para manutenção dos níveis de TSH normais. Fica claro a necessidade de avaliarmos melhor a atividade da D2 no sistema nervoso central onde já está bem descrito sua atividade em hipófise, hipotálamo, hipocampo e outras regiões (Bianco, 2005). Assim, podemos associar essas contradições à diferença entre as metodologias e os protocolos experimentais, uma vez que nossa metodologia só priva ou restringe apenas a fase REM do sono enquanto os outros trabalhos



que associam a função tireoidea com a privação de sono utilizam uma metodologia que priva o tempo de sono total.

Podemos concluir que existe uma diferença na modulação da função tireoidea entre casos seletivos e crônicos de privação de sono, uma vez que observamos diminuição nos níveis de T4 e TSH séricos apenas nos casos seletivos, mas não nos casos crônicos de restrição de sono paradoxal. Nós também observamos diferenças entre a atividade da D2 no tecido adiposo marrom e na hipófise entre estes dois modelos de privação de sono. Por outro lado, o T3 aumentou tanto na privação quanto na restrição de sono paradoxal, isso pode ser explicado pela diferença na modulação da atividade da D2 em estresse agudo e crônico (Bianco *et al*, 2005), no entanto estudos posteriores serão necessários para que possamos esclarecer melhor em que momento o estresse por privação de sono atua periféricamente e/ou centralmente na modulação da função tireoidea bem como na atividade da D2.

**CONCLUSÃO**

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados, podemos concluir que a modulação da função tireóidea é diferente em relação à privação de sono seletiva e crônica em ratos, uma vez que na privação de sono por 24 ou 96 horas, observamos aumento da corticosterona e do T3 séricos, menor ganho de peso corporal, diminuição dos níveis séricos de T4 e TSH, diminuição da atividade desidase tipo 2 na hipófise e aumento da atividade desta enzima no tecido adiposo marrom, enquanto que na restrição de sono por 21 dias as alterações observadas se restringiram apenas ao aumento do T3 sérico e menor ganho de peso corporal.

Neste estudo também avaliamos o efeito do sono rebote por 24 horas, sendo claro que a sua influência também é diferente perante situações de privação de sono paradoxal ou restrição de sono, pois o rebote consegue normalizar os níveis séricos de T4 e o ganho de peso corporal na privação de sono por 24 horas, e normaliza os valores de TSH após 96 horas de privação, mas após período crônico de privação de sono, seu único efeito é a diminuição da atividade desidase tipo 2 na hipófise. Estudos posteriores serão necessários para esclarecermos o mecanismo responsável pela supressão do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide na privação de sono paradoxal, além de tentarmos elucidar o papel das enzimas desidases na regulação da função tireoidea durante a privação de sono paradoxal e a restrição de sono.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allard JS, Tizabi Y, Shaffery JO, Manaye K. Effect of rapid eye movement sleep deprivation on hypocretin neurons in the hypothalamus of a rat model of deprivation. *Neuropeptides* 2007; 41:329-37

Alvarenga TA, Patti CL, Andersen ML, Silva RH, Calzavara MB, Lopez GB, Frussa-Filho R, Tuffik, S. Paradoxal sleep deprivation impairs acquisition, consolidation, and retrieval of a discriminative avoidance task in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2008;90:624-632

Andersen ML, Valle AC, Timo-Laria C, Tufik S. Registro e identificação das fases do ciclo vigília-Sono-análise dos eletroscilogramas. Em: UNIFESP (ed.) Implantação de eletrodos para o estudo eletrofisiológico do ciclo vigília-sono do rato. UNIFESP Ed. Ltda. São Paulo, Brasil; p.43-59, 2001.

Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Influence of paradoxical sleep deprivation and cocaine on development of spontaneous penile reflexes in rats of different ages. *Brain res* 2003; 968:130-138

Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Hormone treatment facilitates penile erection in castrated rats after sleep deprivation and cocaine. *J Neuroendocrinol* 2004a; 16:154-159

Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. effect of chronic stress on steroid hormones secretion in male rats. *Braz J Med Res* 2004b;37:791-797

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S. Experimental Procedure. Em: UNIFESP (Ed.) Ethical and Practical Principles of the Use of Laboratory Animals. São Paulo, Brasil; p. 45-69, 2004c

Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J sleep Res* 2005; 14:83-90

Andersen ML, Antunes IB, Tufik S. Effects of paradoxical sleep deprivation on genital reflexes in five rats strains. *Horm Behav* 2006; 49:173-80

Andersen ML, Martins, Alvarenga TA, Antunes IB, Papale LA, Tufik S. Progesterone reduces erectile dysfunction in sleep-deprived spontaneously hypertensive rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:7

Antunes IB, Andersen ML, Baracat EC, Tufik S. The effect of paradoxal sleep deprivation on estrous cycles of the female rats. *Horm Behav* 2006; 49:49:433-440

Araújo MP, Andersen MI, Albino VC, Gomes DC, Carvalho RC, Silva RH, Ribeiro R de A, Tufik S, Fussa-Filho R. Sleep deprivation abolishes the locomotor stimulant effect of ethanol in mice. *Brain Res Bull* 2006; 69:332-7

Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 1953; 118:273-274

Benedetti F, Dallaspezia S, Fulgosi MC, Barbini B, Colombo C, Smeraldi E. Phase advance is an actimetric correlate of antidepressant response to sleep deprivation and light therapy in bipolar depression. *Chronobiol Int* 2007; 24(5):921-37

Berry, M.J.; Kieffer, J.D.; Harney, J.W.; Larsen, P.R. Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase. *The Journal of Biological Chemistry* 266(22): 14155-14158, 1991.

Bianco, A.C.; Salvatore, D.; Gereben, B.; Berry, M.J.; Larsen, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* 23:38-89, 2002.

Bianco AC, Silva JE 1987 intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue *70:295-300, 1987*

Bergmann MB, Kushida CA, Everson CA, Gilliland MA, Obermeyer W, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in rats:II Methodology. *Sleep* 1989;12:5-12

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254, 1976.

Borbély AA. A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol* 1982; 1:195-204

Carol A. Everson<sup>1</sup> and Thaddeus S. Nowak, JR.<sup>2</sup> Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone mRNA responses to hypothyroxinemia induced by sleep deprivation *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E85–E93, 2002.

Carvalho SD, Kimura ET, Bianco AC, Silva JE, Central role of Brown adipose tissue thyroxine 5-deiodinase on thyroid hormone-dependent thermogenic response to cold. *Endocrinology* 128:2149-2159, 1991

Croteau, W. Davey, J.C., Galton, V.A., D.L.St. Germain. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. *The American Society for Clinical Investigation* 98(2): 405-417, 1996.

Davis H, Davis PA, Loomis AL, Harvey EN, Hobart G. Changes in human brain potentials during the onset of sleep. *Science* 1937; 86(2237):448-450

Dement W, Kleitman N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1957; 9:673-90

Donald.L.St.German, Valerie Anne Galton and Arturo Hernandez. Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: Current concepts and challenges. *Endocrinology* 2009;150(3):1097-1107

Evans JI, Maclean AM, Ismail AA, Love D. Circulating levels of plasma testosterone during sleep. *Proc R Soc Med* 1971; 64:841-2

Everson CA, Crowley WR. Reduction in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286:E1060-70

Fortunato FS, Marassi MP, Chaves EA, Nascimento JHM, Rosenthal D, Carvalho DP. Chronic administration of anabolic androgenic steroid alters murine thyroid function. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 2:256-261

Frussa-Filho R, Gonçalves MT, Andersen ML, de Araújo NP, Chinen CC, Tufik S. Paradoxal sleep deprivation potentiates amphetamine-induced behavioural sensitization by increasing its conditioned component. *Brain Res* 2004; 1003:188-193

Galton, V.A.; Martinez, E.; Hernandez, A.; sT Germain, E.A.; Bates, J.M.; ST Gt, D.L. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in rat uterus and induced during pregnancy. *Endocrinology* 142: 2123-2128, 2001. Germain, D.L. ST. & Galton, V.A. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* 7:655-668, 1997.

Giedke H, Schwärzler F. Therapeutic use of sleep deprivation in depression. *Sleep Med Rev* 2002; 6:361-77

Greenspan, F.S. The Thyroid In: Greenspan, FS & Baxter, Basic & Clinical Endocrinology, JD 4<sup>a</sup> ed., Appleton & Lange eds, cap 4, pp. 160-226, 1994.

Guzman-Marin R, Bashir T, Suntsova N, Szymusiak R, McGinty D. Hippocampal neurogenesis is reduced by sleep fragmentation in adult rat. *Neuroscience* 2007; 148:325-33

Hipólido DC, Moreira KM, Barlow KB, Wilson AA, Nobrega JN, Tufik S. Distinct effects of sleep deprivation on binding to norepinephrine and serotonin transporters in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29:297-303

Ishii, H.; Inada, M.; Tanaka, K.; Mashio, Y.; Naito, K.; Nishikawa, M.; Matsuzuka, F.; Kuma, K.; Imura, H. Sequential deiodination of thyroxine in human thyroid gland. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 55(5): 890-896, 1982.

Jouvet M, Michel F. Electroencephalographic aspects of habituation to the arousal reaction. *J Physiol (Paris)* 1959; 51:489-90

Larsen P. Reed Type 2 Iodothyronine Deiodinase in Human Skeletal Muscle: New Insights into Its Physiological Role and Regulation *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 June; 94(6): 1893–1895.

Lucia A, de Jesus, Suzy D. Carvalho, Mirian O. Ribeiro, Mark Schneider, Sung-woo Kim, Juhn W. Harney, P.Reed Larsen, Antonio C. Bianco. The type2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest.*2001;108(9):137

Lobo LL, Tufik S. Effects of alcohol on sleep parameters of sleep-deprived healthy volunteers. *Sleep.* 1997 Jan;20(1):52-9.

Köhrle, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Molecular and Cellular Endocrinology* 151:103-119, 1999.

Lejeune-Lenain C, Van Cauter E, Désir D, Beyloos M, Franckson JR. Control of circadian and episodic variations of adrenal androgens secretion in man. *J Endocrinol Invest* 1987; 10:267-76.

Marassi MP, Fortunato RS, Silva ACM, Pereira VS, Carvalho DP, Rosenthal D, Costa VMC. Sexual dimorphism in thyroid and type 1 iodothyronine deiodinase activity in pré-puberal and adult rats. *Journal of endocrinology* 2007; 192:121-130

Michael Kluge, Petra Schüssler, Jutta Weikel, Martin Dresler, Verena Zuber, Florian Querfurt, Alexander yassouridis, Axel steiger Altered nocturnal hormone (GH) secretion in obsessive compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31(9):1098-1104

Ortiga, T.M.R. Secreção in vivo de tireotrofina basal e pós TRH de adenohipófises de ratos hipo e hipertireoideos. Monografia apresentada no Instituto de Biologia (UERJ) para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Rio de Janeiro, 1992.



Palma B.D., Hipolide D.C. and Tufik S. Effects on prolactin secretion and binding to dopaminergic receptors in sleep-deprived lupus-prone mice Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2009 42: 299-304

Rechtschaffen e Siegel. sleep and dreaming in: principles of neura science 4<sup>th</sup> Edition 2000 (ed) Eric R. Kandel

Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Buijs MR, Escobar C. internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. Neuroscience 2008; 154:922-31.

Salvatore, D.; Bartha, T.; Harney, J.W.; Larsen, P.R. Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. Endocrinology 137: 3308-3315, 1996.

Shahab M, Irfans S, Zaman WU, Wahab F. Short-term fasting attenuates the response of the HPG axis to kisspeptin challenge in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). 2008 7;83 (19-20): 633-7

Suchecki D, Antunes J, Tufik S. Palatable solutions during paradoxal sleep deprivation: reduction of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and lack of effect on energy imbalance. J Neuroendocrinol 2003; 15:815-21

Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. Lancet 1999; 354(9188):1435-9

St Germain, D.L, Hernandez, A., Schneider, M.J.; Galton.V.A. Insights into the role of deiodinases from studies of genetically modified. Thyroid 15(8):905-915, 2005

Takahashi Y, Kipnis DM, Daughaday WH. Growth hormone secretion during sleep. J Clin Invest 1968; 47:2079-90

Tanaka, K.; Murakami, M.; Greer, M.A. Type-II thyroxine 5'-deiodinase is present in the rat pineal gland. Biochemical and Biophysical Research Communications 137(2): 863-868, 1986.

Tasali E, Leproult R, Ehrmann DA, Van Cauter E. Slow-wave sleep and risk of type 2 diabetes in humans. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105:1044-9

Timo-Laria C, Negrão N, Schmidek WR, Rocha TL, Hoshino K. Phases and states of sleep in the rat. Physiol Behav 1970;5:402-407

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.

Van Cauter E, Holmback U, Knutson, Leproult R, Miller A, Nedeltcheva A, Pannain S, Penev P, Tasali E, Spiegel K. Impact of sleep and sleep loss on neuroendocrine and metabolic function. *Hormone Res* 2007; 67:2-9

Van Cauter E, Spiegel K. Sleep as mediator of the relationship between socioeconomic status and health: a hypothesis. *Ann NY Acad Sci* 1999; 896:254-61

Vogel GW. A review of Rem sleep deprivation. *Arc Gen Phych* 1975; 32:749-760

Zager A, Andersen ML, Ruiz FS, Antunes IB, Tufik S. Effect of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. *Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol* 2007; 293:504-509