

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE

**MODULAÇÃO DA FUNÇÃO TIREÓIDEA APÓS PRIVAÇÃO DE SONO
PARADOXAL EM RATOS ADRENALECTOMIZADOS OU TRATADOS
COM PROPRANOLOL**

NAYANA COUTINHO RODRIGUES

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

**MODULAÇÃO DA FUNÇÃO TIREÓIDEA APÓS PRIVAÇÃO DE SONO
PARADOXAL EM RATOS ADRENALECTOMIZADOS OU TRATADOS COM
PROPRANOLOL**

NAYANA COUTINHO RODRIGUES

Sob a orientação da professora

Dra. Michelle Porto Marassi

Tese de doutorado para obtenção do grau de **Doutora em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Seropédica, RJ

Dezembro, 2016

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Biblioteca Central /
Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R696m

RODRIGUES, NAYANA COUTINHO, 1984-
MODULAÇÃO DA FUNÇÃO TIREÓIDEA APÓS PRIVAÇÃO DE SONO
PARADOXAL EM RATOS ADRENALECTOMIZADOS OU TRATADOS COM
PROPRANOLOL / NAYANA COUTINHO RODRIGUES. - RIO DE
JANEIRO, 2016.
63 f.: il.

Orientadora: MICHELLE PORTO MARASSI.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2016.

1. HORMÔNIOS TIREOIDIANOS. 2. PRIVAÇÃO DO SONO -
EFEITO FISIOLÓGICO. 3. SISTEMA ENDÓCRINO. 4. RATOS COMO
ANIMAIS DE LABORATÓRIOS. I. MARASSI, MICHELLE PORTO,
1981-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

NAYANA COUTINHO RODRIGUES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração em Fisiologia e Farmacologia.

TESE APROVADA EM 20/12/2016

Dr^a Michelle Porto Marassi (Orientadora – UFRRJ)

Prof. Dr. Rodrigo Soares Fortunato (Membro Externo – UFRJ)

Prof. Dr. Fábio Fagundes da Rocha (Membro Interno – UFRRJ)

Prof^a Dr^a Luciene de Carvalho Weide (Membro Externo – UFF)

Prof. Dr. Wagner Seixas da Silva (Membro Externo – UFRJ)

Agradecimentos

Em primeiro lugar à Deus, por confiar tanto em mim, pois esse doutorado está sendo a maior prova disso.

Em segundo lugar a minha orientadora, que hoje posso falar que é uma amiga por toda compreensão e por acreditar que eu era capaz, mesmo que por muitos momentos nem eu acreditasse que conseguiria.

No início deste trabalho perdi dois filhos, minha mãe, minha rainha, amiga e admiradora e poucos sabem como foi difícil chegar até aqui a esses poucos agradeço em especial minha amiga Marissa, minha comadre que tanto me ajudou nos experimentos de cada dia e nos cuidados com meu príncipe e seu afilhado Miguel Coutinho Rodrigues, meu filho, meu presente e minha razão de viver, minha avó Sulema Delocco que mesmo sem entender o por que de tantos ratos sempre esteve ao meu lado.

A professora Alba por toda ajuda profissional e emocional nesses 4 anos de doutorado,

À memória de minha mãe que sempre acreditou em mim e a felicidade de meu filho, dedico esse trabalho que a pesar das dificuldades - e não foram poucas- posso falar que cada virgula desta tese foi feita por mim com ajuda, claro, dos colegas de trabalho

RESUMO

A vida moderna vem diminuindo o tempo de sono da maioria dos homens devido às exigências da vida moderna, os efeitos dessa diminuição tem sido extensivamente estudados nos últimos anos em homens e em modelos animais, No entanto os efeitos da privação de sono na função tireoidiana são pouco estudados. O nosso grupo foi pioneiro em demonstrar os efeitos da privação de sono REM na função tireoidiana, trabalhos anteriores relacionados à função tireoidiana faziam privação de sono total. Neste trabalho nosso objetivo foi avaliar se os efeitos observados anteriormente na função tireoidiana após privação de sono REM eram diretamente pela privação de sono ou secundários a um hiperadrenocorticismo e/ou hiperestimulação β -adrenérgica. Ratos machos (250-300g) do biotério da UFRRJ foram mantidos em ciclo claro-escuro (7-19h) temperatura controlada ($22^\circ \pm 2^\circ\text{C}$) com comida e água *ad libitum*; Para o protocolo do propranolol os animais foram distribuídos em: 1 controle (C), com padrão de sono normal; 2 controle tratado com propranolol (C+P); 3 privados de sono por 24h (P24); 4 privados de sono por 24h com rebote de 24h (P24R); 5- P24 tratados com propranolol (P24+P) e, 6 P24R tratados com propranolol (P24R+P). Todos os animais foram tratados com benzoato de propranolol na dose 30mg/Kg ou com água nos grupos controles por 14 dias. Para o protocolo da adrenalectomia (Ax), os animais foram anestesiados e adrenalectomizados, falso operados (Fo), após 10 dias de cirurgia os animais foram distribuídos em: Fo, Ax adrenalectomizados com padrão de sono normal; privados de sono por 24h ou 96 com seus respectivos rebotes(P24, P96, P24R e P96R) e Ax privados de sono por 24 e 96 horas com seus respectivos rebotes (AxP24, Ax P96, AxP24R e AxP96 e AxP96R). Todos os animais foram eutanaziados no mesmo dia, sangue coletado para análise de T3, T4, TSH e corticosterona; fígado(F) e tireoide(T) para análise da desidase tipo 1 (D1), hipófise(H), tecido adiposo marrom (TAM) e hipotálamo(HP) para a atividade da desidase tipo 2 (D2). Todo procedimento foi aprovado pelo comitê de ética da UFRRJ 003/2015. O T4 diminui em ambos os protocolos, o T3 não muda no protocolo do propranolol, onde a D1 aumenta no F em todos os grupos e não sofre alteração na T, a D2 aumenta no TAM apenas em P24+P e em P24R+P no HP enquanto em H D2 diminui em C+P e P24+P e o rebote normaliza. A corticosterona diminuiu em todos os Ax e AxP24, já no Ax96 houve uma normalização dessa diminuição. O TSH aumentou em Ax e normalizou em AxP24 e AxP24R quando comparados ao Fo. Podemos concluir que a diminuição do T4 é independente de uma hiperativação adrenérgica, pois nem a adrenalectomia nem o bloqueio β -adrenérgico foram eficazes na manutenção dos níveis de T4 e que a privação de sono leva à uma falha no mecanismo de feedback uma vez que o T4 diminuído não estimula o aumento do TSH e que provavelmente o T3 não sofre alteração devido ao aumento da conversão periférica de T4-T3.

ABSTRACT

Modern life is shortening the sleep time and the consequences of this decreased has been studied in humans and animal models. Nevertheless, the effects of sleep deprivation in thyroid function are rarely studied. Our group pioneered in demonstrating the effects of paradoxical sleep deprivation in the thyroid function; previous study related to thyroid function did full sleep deprivation. In this study, our objective was evaluating if the recent data we observed effects on thyroid function after paradoxical sleep deprivation were due to the sleep deprivation or secondary to an hyperadrenocorticism and/or β -adrenergic hyperstimulation. Male rats (250-300g) from UFRRJ, animal care were kept in light-dark cycles (7-19h), controlled temperature ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) with food and water *ad libitum*. For the propranolol protocol, the animals were distributed in 6 groups: 1 control (C), with a regular sleep pattern; 2 control treated with propranolol (C+P); 3 sleep deprived for 24h (P24); 4 sleep deprived for 24h with a 24h rebound period (P24R); 5 P24 treated with propranolol (P24+P) and 6 P24R treated with propranolol (P24R+P). All animals were treated with a 30mg/Kg dosage of propranolol benzoate or water in the control groups, for 14 days. For the adrenalectomy protocol, (Ax), the animals were anesthetized e adrenalectomized, or Sham, after 10 days of surgery the animals were divided as: Sham, sleep deprived for 24h or 96 with their respective rebound periods (P24, P96, P24R and P96R) e sleep deprived Ax for 24 e 96 hours with their respective rebound periods (AxP24, Ax P96, AxP24R e AxP96 and AxP96R). All animals were euthanized on the same day; blood was collected for T3, T4, TSH e corticosterone analysis; liver(F) and thyroid(T) for type 1 deiodinase (D1), hypophysis (H), brown adipose tissue (TAM), hypothalamus (HP) for type 2 deiodinase (D2) activity. The entire procedure was approved by UFRRJ Ethics Committee 003/2015. T4 decreased in both protocols, T3 had no change in the propranolol protocol, where the D1 increases at the F in all groups and sees no changes in the T; D2 increases on TAM only in P24+P and P24R+P at the HP, while in the H D2 decreased on C+P and P24+P but normalizes after the rebound period. Corticosterone decreased in all Ax e AxP24, yet on Ax96 this decrease normalized. TSH increased in Ax e and normalized in AxP24 e AxP24R when compared to Sham. We can conclude that the decrease in T4 is independent to an adrenergic hyperactivation, for neither the adrenalectomia nor the β -adrenergic block were effective in maintaining T4 levels and sleep deprivation leads to a failure in the feedback mechanism once the diminished T4 doesn't stimulate a TSH increase and that T3 probably suffers no alteration due to the increase in T4-T3's peripheral conversion.

LISTA DE ABREVEATURAS

EEG Registro eletroencefalográfico

REM Sono de movimentos oculares rápidos (*do inglês rapid eye movement*)

GH Hormônio do crescimento

HT Hormônios tireoideos

TRH Hormônio liberador de tirotrófina

TSH Hormônio estimulador da tireoide

NIS co-transportador Na⁺/I⁻, *Sodium Iodide Symporter*

MIT Monoiodotrofina

DIT Diiodotirosina

TPO Enzima tireoperoxidase

D1 e D2 Iodotironina desidases tipo 1 e tipo 2

TAM Tecido adiposo marrom

ACTH Hormônio adenocorticotrópico

GPX glutationa peroxidase

SOD superóxido dismutase

H2O2 Peroxido de hidrogênio

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 demonstrando a alternância das fases vigília, sono Não REM fases 1,2,3 e 4 e sono REM, mmspf.msdonline.com.br/seção_06/cap_064.html.

Figura 4. Representação esquemática da síntese dos hormônios tireoidianos.. Adaptado de Pardo, 2007.

Figura 5. 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.

Figura 6. Foto representativa da metodologia das plataformas múltiplas modificada utilizada para a privação de sono paradoxal em nosso estudo.

Figura 7. Níveis séricos de T4 (A) e de T3 (B) nos grupos: controle (C); controle tratado com propranolol (C+P); privados de sono por 24 horas (P24); privados de sono por 24 horas com rebote (P24R); privados de sono por 24 horas tratado com propranolol (P24+P) e privados de sono por 24 horas com rebote e tratado com propranolol (P24R+P). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

Figura 8. Atividade da iodotironina desiodase tipo 1 na tireoide (A) e no fígado (B) nos grupos: controle (C); controle tratado com propranolol (C+P); privados de sono por 24 horas (P24); privados de sono por 24 horas com rebote (P24R); privados de sono por 24 horas tratado com propranolol (P24+P) e privados de sono por 24 horas com rebote e tratado com propranolol (P24R+P). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si..

Figura 9 Atividade da iodotironina desiodase tipo 2 no tecido adiposo marrom (A), na hipófise (B) e no hipotálamo (C) nos grupos: : controle (C); controle tratado com propranolol (C+P); privados de sono por 24 horas (P24); privados de sono por 24 horas com rebote (P24R); privados de sono por 24 horas tratado com propranolol (P24+P) e privados de sono por 24 horas com rebote e tratado com propranolol (P24R+P). Letras diferentes identificam médias que diferem

significativamente ($p < 0,05$) entre si.

Figura 10. . Níveis séricos de corticosterona nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24h (P24) adrenalectomizados privado de sono por 24 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

Figura 11. Níveis séricos de T3 (A) e de T4 (B) nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24 h (P24), privados de sono por 24 h com rebote (P24R), adrenalectomizados privado de sono por 24 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

Figura 12. Níveis séricos de TSH nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24 h (P24), privados de sono por 24 h com rebote (P24R), adrenalectomizados privado de sono por 24 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

Figura 13. Níveis séricos de corticosterona nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 96 horas (P96), privados de sono por 96 horas com rebote (P96R), adrenalectomizados privado de sono por 96 horas (AxP96) e adrenalectomizados privado de sono por 96 horas com rebote (AxP96R). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

Figura 14. Níveis séricos de T3 (A) e de T4 (B) nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 96 h (P96), privados de sono por 96 h com rebote (P96R), adrenalectomizados privado de sono por 96 horas (AxP96) e adrenalectomizados privado de sono por 96 horas com rebote (AxP96R). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

Figura 15: atividade da gltationa peroxidase nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24 h (P24), privados de sono por 24 h com rebote (P24R), adrenalectomizados privado de sono por 96 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R).

Figura 16: atividade da catalase nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24 h (P24), privados de sono por 24 h com rebote (P24R), adrenalectomizados privado de sono por 96 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote

(AxP24R).

Figura 17: atividade da superóxido dismutase nos grupos: falso operado (FO), adrenaectomizados (Ax), privados de sono por 24 h (P24), privados de sono por 24 h com rebote (P24R), adrenaectomizados privado de sono por 96 horas (AxP24) e adrenaectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Sono	16
2.2 Vigília	16
2.3 Sono não-REM	17
2.4 Sono REM	18
2.5 Sono e Regulação Hormonal	19
2.6 Tireoide	26
2.7 Privação de Sono e Sistema Endócrino	27
2.8 Privação de Sono e Tireoide	30
3 OBJETIVO	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
4.2 Privação de sono paradoxal	31
4.3 Grupos Experimentais	33
4.3.1 Protocolo propranolol	33
4.3.2 Protocolo adrenalectomia	33
4.4 T3, T4 e corticosterona	34
4.5 TSH	34
4.6 Atividade da D1	35
4.7 Atividade da D2	36
4.8 Enzimas antioxidantes	37
4.9 Análise Estatística	38
5 RESULTADOS	
5.1 Protocolo Propranolol	40
5.2 Protocolo adrenalectomia	43
5.3 Enzimas antioxidantes	48
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	58
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Historicamente o tempo que os seres humanos passam dormindo ocupa 1/3 do tempo total da vida de cada indivíduo. O sono é uma fase da vida de todos os animais superiores e até de alguns invertebrados, muito importante para manutenção da homeostase. 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. 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.

Essas três fases se alteram ciclicamente durante as horas de sono, tendo a fase REM seus episódios prevalentemente nas últimas horas de sono. A vida moderna vem encurtando o tempo de sono dos seres humanos seja por excesso de trabalho, estudo, atividades de entretenimento ou mesmo disfunções fisiológicas, sendo a fase REM a mais encurtada, pois poucos conseguem dormir às 8 horas necessárias devido as atividades do dia a dia.

Nos últimos anos os efeitos da privação de sono têm sido extensivamente estudados em diversos modelos e sistemas. Poucos trabalhos relatam os efeitos da privação de sono e função tireóidea, alguns trabalhos relatam efeitos da privação de sono total na função tireóidea, entretanto, nosso grupo é pioneiro no estudo dos efeitos da privação de sono REM (paradoxal) nas alterações da função tireoidiana e no metabolismo extratireóideo das iodotironinas de ratos machos e fêmeas.

A glândula tireoide é responsável pela síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (HT) tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), a regulação desta glândula é feita através de mecanismos centrais no hipotálamo e na glândula hipófise que produzem TRH e TSH, respectivamente, e controlados pelo mecanismo de *feedback* negativo. O TRH é produzido no hipotálamo e através da via porta-hipofisária, estimula a hipófise a sintetizar e liberar o TSH 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 hormônio tireoideano 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 e 2 (D1, D2 e D3, respectivamente), que são capazes de promover a desidiação do anel externo do T4 (D1 e D2) produzindo T3 ou do anel interno do T4 (D1 e D3) produzindo T3 reversa, que parece também não ter atividade biológica, assim essas enzimas são responsáveis pela ativação ou inativação dos hormônios tireóideos. Muitos trabalhos vêm demonstrando que outros sistemas endócrinos são capazes de modular a função tireoidea, como os sistemas cardiovascular, gonadais e adrenais entre outros. Os efeitos do estresse sobre a função tireoideana têm sido extensivamente estudados nos últimos anos, nosso grupo observou que a privação de sono paradoxal é capaz de modular a função tireoideana de ratos machos e fêmeas alterando os níveis séricos dos hormônios TSH, T4 e T3, no entanto, se os efeitos observados foram devido à privação de sono ou ao estresse causado por ele, não era esclarecido.

Neste trabalho nosso objetivo foi avaliar se os efeitos sobre a função tireoideana observados anteriormente em ratos machos privados de sono paradoxal foram devido à privação de sono ou se foram secundários à hiperativação da glândula adrenal e/ou pela estimulação β adrenérgica, além de estudarmos um possível efeito no mecanismo REDOX desta glândula.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sono

O sono é um estágio fisiológico da maioria dos seres vivos, muito importante para manutenção da homeostase. O ciclo vigília-sono é dividido em três fases, vigília, sono REM e sono Não REM, que se diferenciam por seus padrões eletroencefalográficos, electroculográfico e eletromiográfico (Figura 1).

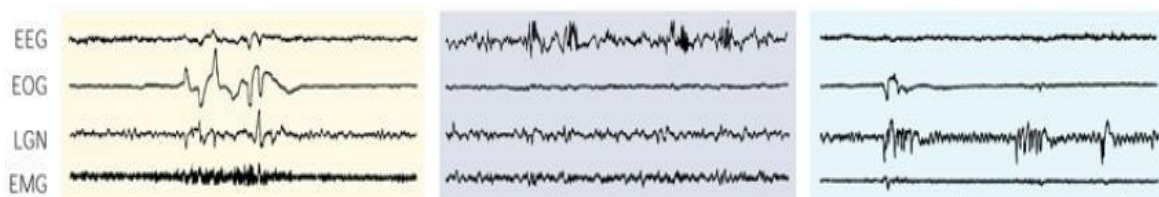


Figura 1. Padrões eletroencefalográfico (EEG) e electroculográfico (EOG), eletrodo no núcleo geniculato lateral (LGN) e padrão eletromiográfico (EMG), nos diferentes estágios: vigília, sono não-REM e sono REM (adaptado de Rechtschaffen e Siegel, 2000).

O sono REM (do inglês *rapid eye movement*), foi assim descrito por Dement e Kleitman (1937), onde observaram que o aumento da atividade cerebral ocorria simultaneamente a movimentos oculares rápidos. Posteriormente, Jouvet e Michel (1957) observaram que apesar de um aumento da atividade cerebral, a atividade muscular é diminuída, ocorrendo uma atonia da musculatura esquelética voluntária, e, por isso denominaram essa fase como sono paradoxal. O sono Não-REM, também conhecido como sono de ondas lentas é dividido em 4 fases de baixa atividade cortical, no entanto não ocorre atonia muscular, essas fases se alternam com a vigília ciclicamente durante as horas de sono e, esses ciclos se diferenciam também entre crianças, adultos e idosos (Figura 2).

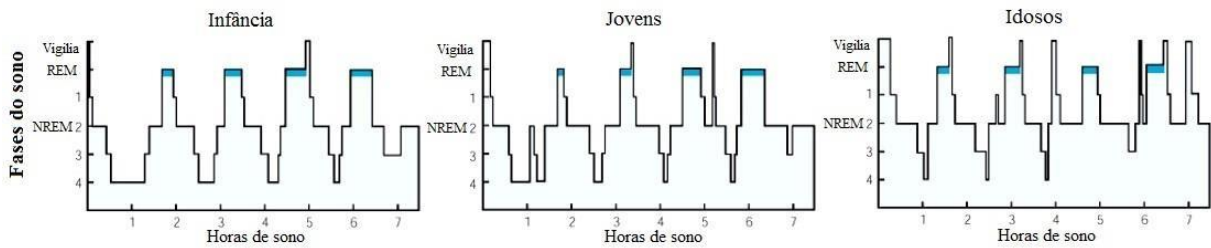


Figura 2. Fases do ciclo do sono: vigília, sono REM e fases 1, 2, 3 e 4 do sono não-REM em diferentes fases da vida: infância, adulto e idosos (adaptado de Rechtschaffen e Siegel, 2000).

O sono possui um efeito modulatório na maioria dos sistemas fisiológicos, sendo bem descritos que o encurtamento das horas de sono é capaz de alterar inúmeros componentes dos sistemas endócrinos.

2.2. Vigília

A vigília é a fase em que estamos acordados, é caracterizada por 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).

Nesta fase alguns hormônios são liberados, como o hormônio do crescimento (GH) que já é bem descrito ter uma relação com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal de mamíferos, onde o aumento do ACTH leva a diminuição da amplitude dos picos de GH (Axel e Steiger, 2006).

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) (Timo-laria *et al.*, 1970; Bergmann *et al.*, 1989; Andersen *et al.*, 2001).

Em humanos, os episódios desta fase ocorrem predominantemente nas últimas horas de sono (Figura 3), sendo por isso a fase mais afetada pelo encurtamento das horas de sono que vem ocorrendo com as exigências da vida moderna. O sono REM também conhecido como sono ativo já é bem descrito por ser muito importante para sintetização e liberação de inúmeros hormônios.

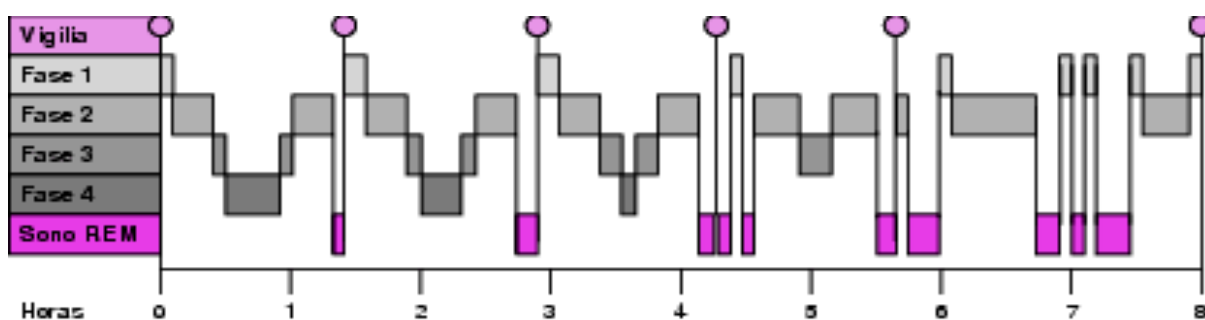


Figura 3. Esquema representativo demonstrando a alternância das fases vigília, sono Não REM fases 1, 2, 3 e 4 e sono REM, (mmspf.msdonline.com.br/seção_06/cap_064.html).

2.5. Sono e Regulação Hormonal

O sono é regulado por fatores circadianos, hormonais e homeostáticos. O núcleo supraquiasmático (NQS) do hipotálamo anterior é a estrutura responsável pela manutenção do ciclo circadiano, que é ativado pela presença ou ausência de luz dependendo do hábito de cada espécie (Kandel 2000). A luz do ambiente estimula o NQS via feixe retino hipotalâmico pela ação do hormônio melatonina que é secretado pela pineal.

Os hormônios gonadais estão relacionados com as fases do sono. Em homens a concentração de testosterona são mínimas no início do sono e máximas nas primeiras horas da manhã (Evans et al., 1971; Lejeune et al., 1987).

Em humanos a concentração de cortisol atinge seus valores máximos durante as primeiras horas da manhã, diminuindo ao longo do dia tendo no início do sono seus menores níveis (Follenius et al., 1992). Na segunda metade do sono os valores deste hormônio apresentam um modesto aumento, onde prevalece a fase REM do sono. O hormônio liberador de corticotrofina (CRH) é o mais marcante neuropeptídeo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), e, é o principal regulador da vigília sendo inibido no sono Não-REM, agindo em regiões hipotalâmicas e extrahipotalâmicas. (Suchecki D et al., 2013).

O TSH, fisiologicamente, tem seus valores máximos no início do sono e mínimos durante o dia. A privação ou mesmo a restrição de sono diminui gradativamente a secreção de TSH, tendo valores máximos no início do sono (Luck et al., 1976; Brabant et al., 1990; Van Cauter & Tasali, 2011).

2.6. Tireoide

✓ Síntese dos hormônios tireoidianos

A glândula tireoide está localizada na cartilagem cricóide da traqueia, possuindo dois lóbulos responsáveis pela síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (HT), 3,5,3', 5' tetraiodotironina (T4), e, em menor quantidade 3, 5, 3' triiodotironina (T3). Sendo estes hormônios essenciais para o crescimento e desenvolvimento (Greenspan, 1994). Os HT também são responsáveis pela manutenção do metabolismo e necessários para função normal de todas as células (YEN, 2001).

A função tireoidiana é modulada pelo mecanismo de *feedback* negativo do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT), onde o núcleo paraventricular do hipotálamo sintetiza e libera via porta-hipofisária o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) que estimula a hipófise a sintetizar e liberar na corrente sanguínea o hormônio estimulador da tireoide (TSH) que age nas células tireoidianas através de seus receptores específicos, estimulando a síntese e secreção de T4 e T3. O aumento dos níveis séricos destes hormônios regula negativamente o eixo HHT, inibindo a síntese e secreção de TRH e TSH. (Yen, 2001).

A síntese dos hormônios tireoidianos depende de uma sequência de eventos: o transporte do iodeto pela membrana basal através do co-transportador Na^+/I^- - NIS (do inglês, *sodium iodine symporter*); síntese e transporte da tireoglobulina (TG), oxidação do iodeto e subsequente iodação dos resíduos tirosil da TG e acoplamento das iodotirosinas monoiodotirosina e diiodotirosinas (MIT e DIT, respectivamente), este processo é catalisado pela tireoperoxidase (TPO) quando esse acoplamento ocorre entre duas moléculas de DIT, forma o T4 e quando este ocorre entre uma molécula de MIT e uma de DIT forma o T3 (Larsen et al., 1998). (Figura 4).

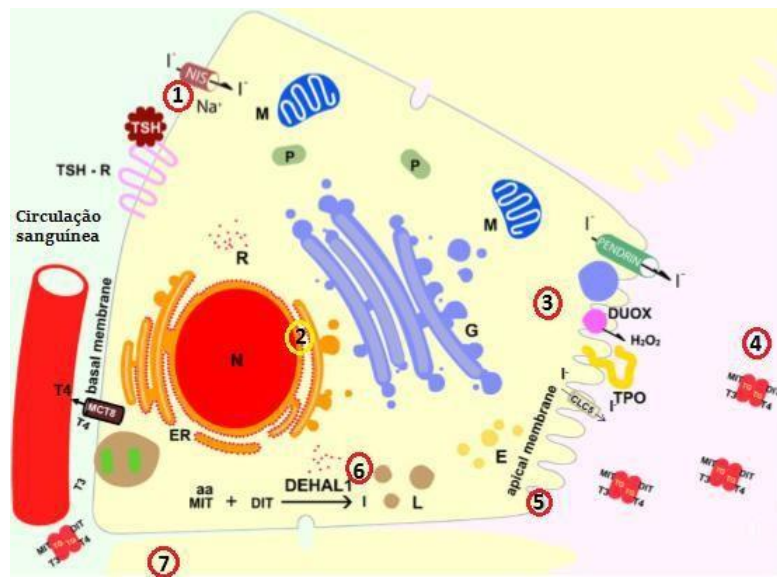


Figura 4: Representação esquemática da síntese dos hormônios tireoidianos. 1) Transporte do iodeto proveniente da dieta para o interior da célula pelo NIS; 2) Transporte do iodeto até o lúmen celular; 3) Oxidação dos íons iodeto pela TPO e H₂O₂; 4) Ligação do iodeto aos resíduos tirosil e formação dos hormônios tireoidianos; 5) Proteólise das moléculas TG-hormônio; 6) Desalogenação de MIT e DIT; 7) Liberação dos hormônios T3 e T4 e moléculas de TG. L: lisossomo; M: mitocôndria; R: ribossomos; P: peroxissomo; G: complexo de Golgi; ER: retículo endoplasmático rugoso; N: núcleo; E: endossomo. Adaptado de Pardo, 2007.

O T4 é gerado exclusivamente pela tireoide, enquanto o T3 sérico é, principalmente, produto da desiodação periférica do T4 pelas iodotironinas desiodases. Esta constatação foi feita na década de 70, onde foi detectado T3 em pacientes tireoidectomizados e repostos apenas com T4, confirmando uma conversão extratireoideia de T4 em T3 (German e Galton, 1997). Esta conversão é feita através das iodotironinas desiodases, presente em todos os vertebrados que podem ativar ou inativar a ação dos hormônios tireoídeos (Bianco et al., 2002)..

O T3 é o hormônio biologicamente ativo, por possuir maior afinidade aos receptores de hormônios tireoidianos (TR). Quando a desiodação ocorre no anel fenólico do T4 é formado o T3, também conhecida como via bioativadora. Quando essa desiodação ocorre no anel tirosílico é formado o T3 reverso (rT3) que é conhecido como via bioinativadora, estes processos são componentes intrínsecos da homeostase dos hormônios tireoidianos (Kohrle, 1999).

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 (tirosoílico) 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 5) Diversos estudos demonstram que fatores estressantes podem influenciar na atividade destas enzimas podendo alterar os níveis séricos dos hormônios tireoidianos (Lima et al., 2006; Lisbôa et al., 1997; Bianco et al., 1987).

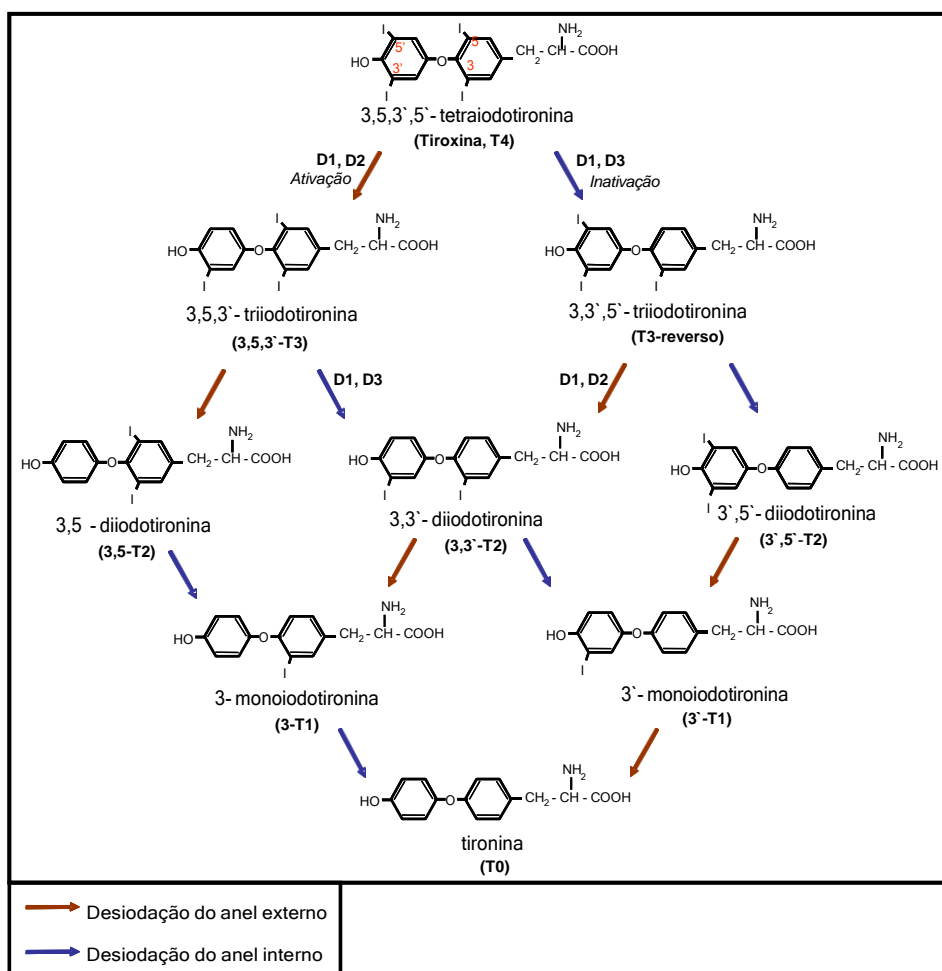


Figura 5. Representação esquemática da cascata de desiodação das iodotironinas. Vias de ativação ou inativação das iodotironinas pelas enzimas desiodases tipo 1 (D1), 2 (D2) e 3 (D3). Adaptado de Leonard & Visser, 1986 e Bianco *et al.*, 2002.

✓ **Iodotironina desiodase tipo 1 (D1)**

A iodotironina desiodase tipo 1 foi a primeira selenoenzima que teve seu sequenciamento realizado em ratos, camundongos, galinhas e humanos (Berry *et al.*, 1999; Maia *et al.*, 2005). Em humanos, a D1 pode ser encontrada no fígado, rim, tireoide (Ishii *et al.*, 1982), hipófise (Koenig, 2005) dentre outros tecidos enquanto em ratos, pode ser encontrado no fígado, rim e sistema nervoso central (SNC), hipófise, intestino, tireoide, tecido adiposo marrom (TAM), músculo esquelético e placenta (Köhrle, 1994; Leonard & Köhrle, 1996; Bianco *et al.*, 2002).

Os hormônios tireoidianos, principalmente o T3 regula positivamente a D1 estimulando diretamente a transcrição desta enzima, aumentando os níveis de RNA mensageiro e da proteína (Meyer *et al.*, 2007). A D1 está ancorada na membrana plasmática através de um único domínio transmembrana voltado para o citosol (Bianco *et al.*, 2006).

A D1 tireoideia parece ser modulada diferentemente de outros tecidos, Erickson e colaboradores (1982), demonstraram que a D1 é regulada positivamente pelo TSH, este achado foi confirmado posteriormente por Leonard & Visser (1986) e Köhrle (1999). Muitos estudos vem demonstrando que outros hormônios como estrogênio, testosterona e os glicocorticoides, podem regular a atividade desta enzima e, conseqüentemente, alterar os níveis séricos dos HT (Gereben *et al.*, 2008).

✓ **Iodotironina desiodase tipo 2 (D2)**

A D2 é a selenoenzima conhecida como enzima ativadora do hormônio tireoidiano, uma vez que esta só é capaz de desiodar o anel externo do T4, convertendo-o em T3, esta conversão ocorre no interior das células, pois, o seu sítio ativo COOH está localizado no citosol enquanto a porção NH₂ se encontra no lúmen do retículo endoplasmático (Bianco *et al.*, 2002).

A D2 está localizada predominantemente no SNC, tecido adiposo marrom (TAM), útero gravídico, glândula pineal e timo de ratos (Germain e Galton, 2005; Galton *et al.*, 2001; Bianco *et al.*, 2002). Em humanos a D2 também foi encontrada em tireóide, artéria coronária, coração, na medula espinhal e, em menor quantidade em rim, pâncreas e musculo esquelético (Tanaka *et al.*, 1986; Croteau *et al.*, 1996; Salvatore *et al.*, 1996; Bianco *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2009).

Estudos demonstram que a D2 no TAM é essencial para manutenção da termogênese, onde sua atividade é aumentada em ratos expostos ao frio (Bianco e sinva, 1987; carvalho *et al.*, 1991). Jesus e colaboradores demonstraram em animais *knickout* para D2, quando expostos ao frio apresentam hipotermia e só sobrevivem com aumento dos tremores, seguida de uma considerável perda de peso corporal. Esta ação termogênica da D2 leva ao aumento da transcrição das UCP 1 e UCP 3, proteínas desacopladoras do complexo fosforilação oxidativa mitocondrial levando ao aumento da produção de calor (Moreira *et al.*, 2005). A D2 no TAM é regulada positivamente pela atividade simpática, Bianco e colaboradores (2005), demonstraram que o aumento da atividade simpática eleva a atividade da D2 em 50% neste tecido.

✓ **Regulação da função tireoidiana**

Além dos mecanismos intrínsecos do eixo HHT para modulação da função tireoidiana, outros sistemas endócrinos são capazes de modular positiva ou negativamente a função tireoidiana.

Os distúrbios tireoidianos são mais comuns em mulheres do que em homens, esses distúrbios estão associados à mudanças nos níveis dos esteroides sexuais, em particular durante a puberdade, gestação e menopausa (Marassi *et al.*, 2007).

Os glicocorticoides também são importantes moduladores da função tireoidiana diretamente pela inibição da secreção de TSH ou pelo aumento da conversão periférica do T4 pela D2, principalmente no TAM. Neste tecido já é bem descrito que os glicocorticoides aumentam a atividade da D2 via receptores β -2. A diminuição destes hormônios ou mesmo o bloqueio medicamentoso dos receptores adrenérgicos inibem a atividade desta enzima.

✓ **Tireoide e propranolol**

Inúmeros fármacos de uso amplo na clínica podem alterar os mecanismos de produção dos HT e do metabolismo extratireoidiano. O propranolol é um β -bloqueador não seletivo amplamente utilizado no tratamento de arritmias cardíacas, angina, hipertensão arterial e no tratamento adjuvante a tirotoxicose (Fonseca WC & Melek FE 2013).

Muitos trabalhos vêm associando inúmeros tipos de estresse com a função tireoidiana, e, utilizando o propranolol para analisar a atividade da D2 sendo modulada pelo estímulo β -adrenérgico, no entanto esses resultados são contraditórios. Bocco e colaboradores (2016) observaram que o propranolol é capaz de impedir o aumento da D2 nos músculos soleus e gastroquinêmio após o exercício em ratos. Branco e colaboradores (1999) utilizando a mesma dose de propranolol observaram que a exposição ao frio aumenta a atividade da D2 e que o propranolol não normaliza esse aumento. Já Louzada e colaboradores (2013) observaram que o propranolol diminuiu parcialmente o aumento da D2 no músculo soleus e gastroquinêmio em ratos também expostos ao frio.

✓ **Estresse oxidativo e tireoide**

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) que é continuamente produzida nas células, mas em geral é mantida em baixas concentrações dentro da célula pela ação de algumas peroxidases como a glutathiona peroxidase (GPX) e a catalase além de outros mecanismos antioxidante. Baixas concentrações de H_2O_2 podem agir como segundo mensageiro agindo em inúmeros processos celulares, no entanto altas concentrações de H_2O_2 podem ser tóxicas para a maioria das células.

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, retardam ou inibem a ação das ERO e podem agir em diferentes níveis do estresse oxidativo. Em 1954, Gershan e Gilbert propuseram que a maioria dos efeitos danosos causados pelas concentrações elevadas de oxigênio nos organismos vivos podia ser

atribuída à formação de radicais livres. Entretanto, essa ideia não despertou interesse de muitos pesquisadores até a descoberta, em 1968, de uma enzima que é específica para a remoção catalítica de um radical de oxigênio (Mc Cord & Fridovich, 1969). Essa enzima denominada superóxido dismutase (SOD), juntamente com outras duas – catalase e glutathione peroxidase – são as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A biossíntese dos HTS é catalisada pela TPO que tem o iodeto e tiroglobulina como substrato, no entanto o H₂O₂ é um fator limitante para a biossíntese desses hormônios. O H₂O₂ é produzido na membrana apical do tireócito pela NADPH oxidase (NOX) pela Dual oxidase (DUOX 1/4) (Fortunato, R.S, *et al.*, 2013). A grande concentração de H₂O₂ dentro do tireócito é importante para síntese, sinalização, proliferação da célula tireoidiana (Schweizer U *et al.*, 2008).

A melatonina é um hormônio diretamente relacionado com a indução do sono além de possuir uma atividade antioxidante conhecida, produzido principalmente pela glândula pineal, mas também é produzido em outros tecidos, tais como retina e intestino grosso (Guyton, 1973). A função de antioxidante da melatonina parece desencadear uma proteção substancial contra os radicais livres que são gerados em uma variedade de situações experimentais, incluindo a injúria por isquemia/reperfusão. Por essa razão, ela vem sendo utilizada terapêuticamente em cirurgias e transplantes (Reiter & Maastroni, 1999).

Poucos trabalhos demonstram a atividade das enzimas oxidantes após privação de sono paradoxal. Lungato e colaboradores (2013) demonstraram que a privação de sono paradoxal por 72 horas leva um aumento da SOD em cultura de esplenócitos. Não há trabalhos relacionando a PS com a produção de ERO na tireoide.

2.7. Privação de sono e sistema endócrino

As atividades e cobranças da vida moderna vêm encurtando o tempo de sono da maioria dos seres humanos, seja por excesso de trabalho, estudo, atividades de entretenimento ou mesmo disfunções fisiológicas que levam a insônia. Os efeitos deste encurtamento nos sistemas endócrinos têm sido extensivamente estudados nos últimos anos, 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).

O principal eixo neuroendócrino envolvido na resposta ao estresse é o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA, do inglês: *hypothalamic-pituitary-adrenal*). A ativação do eixo HPA leva a liberação de CRH pelo hipotálamo, que consequentemente induz a liberação de ACTH pela hipófise, que vai estimular a liberação de glicocorticóide pela adrenal, cortisol em humanos ou corticosterona em ratos (Steiger, 2002; Buckley & Schatzberg, 2005). No entanto, os dados relacionando a privação de sono e a liberação de glicocorticóides são muito controversos.

2.8. Privação de sono e tireoide

Apesar de muitos estudos relacionarem os efeitos da privação de sono em inúmeros sistemas endócrinos, poucos estudos relacionam a privação de sono com os hormônios tireóideos. Na década de 90, alguns estudos correlacionaram os efeitos da privação de sono com a função tireóidea, no entanto esta privação não era seletiva de sono paradoxal, e sim, privação total de sono através da metodologia dos discos giratórios. Com esta metodologia, Balzano e colaboradores (1990) observaram uma diminuição do T4 e aumento da atividade da D2 no TAM. Everson e colaboradores (1995) também observaram diminuição do T4 e do T3, e, posteriormente, Everson (2001) observou aumento da expressão de TRH, mas não da D2 no hipotálamo. Nos últimos anos, nosso grupo vem estudando os efeitos da privação seletiva de sono paradoxal (PSP) na função tireoidiana em ratos machos e fêmeas.

Nascimento e colaboradores (2014) não observaram diferença nos níveis de T4 enquanto o T3 aumentou em 24 horas de PSP e o TSH diminuiu tanto em 24 quanto em 96 horas de PSP em ratas intactas. Em ratas castradas, Nascimento e colaboradores (2014) observaram uma diminuição do T4 em 96 horas de PSP e do T3 em 24 e 96 horas de PSP, demonstrando que em fêmeas a PSP não causa diminuição dos hormônios tireoideos provavelmente por uma ação estimulatória/relulatória dos hormônios gonadais femininos.

Nosso grupo (Rodrigues et. al., 2015) observou que a privação de sono paradoxal (PSP) por 24 e 96 horas foi capaz de diminuir os níveis séricos de T4, e o sono rebote foi capaz de normalizar esta diminuição, além disso, a diminuição do T4 foi acompanhada de uma diminuição do TSH sérico. Já o T3 aumentou tanto em 24 quanto em 96 horas de PSP e o sono rebote não foi capaz de normalizar este aumento, havendo concomitante um aumento significativo da atividade da D2 no tecido adiposo marrom e um aumento da corticosterona.

Na clínica, muitos diagnósticos de hipotireoidismo se dão sem uma prévia avaliação da função adrenérgica, sendo muito comum um diagnóstico tardio de hipotireoidismo secundário ao hiperadrenocorticismismo, sendo assim necessário o esclarecimento se os efeitos observados na função tireóidea após privação de sono são pela privação de sono ou secundário a alterações do estresse causado pela privação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar se as alterações tireoidianas causadas pela privação de sono paradoxal em ratos machos são resultado de uma ação direta da privação de sono, ou se são secundárias a uma hiperativação da adrenal, ou se ocorrem devido a um aumento da ativação dos receptores β adrenérgicos, além disso estudamos possíveis alterações no mecanismo REDOX da glândula tireoide.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Analisar os níveis séricos de T3 e T4 em ratos intactos ou tratados com propranolol e privados de sono paradoxal por 24 horas, bem como o efeito rebote.
- ✓ Analisar a atividade da iodotironina desidase tipo 1 e 2 em ratos intactos ou tratados com propranolol e privados de sono paradoxal por 24 horas, bem como o efeito rebote.
- ✓ Analisar os níveis séricos de corticosterona em ratos intactos ou adrenaectomizados e privados de sono paradoxal por 24 e 96 horas, bem como o efeito rebote.
- ✓ Analisar os níveis séricos de T3 e T4 em ratos intactos ou adrenaectomizados e privados de sono paradoxal por 24 e 96 horas, bem como o efeito rebote.
- ✓ Analisar os níveis séricos de TSH em ratos adrenaectomizados e privados de sono paradoxal por 24 horas.
- ✓ Avaliar a atividade do glutathione peroxidase, catalase e da superóxido dismutase na tireoide de ratos intactos ou privados de sono por 24 horas, bem como o efeito rebote.

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°. 003-2015

4.2. Privação de sono paradoxal

O protocolo usado para a privação de sono paradoxal (PSP) foi baseado na metodologia das plataformas múltiplas modificada (Andersen et al., 2004). Para a PSP foram utilizadas 8 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.



Figura 6. Foto representativa da metodologia das plataformas múltiplas modificada utilizada para a privação de sono paradoxal em nosso estudo.

4.3. Grupos experimentais

Ratos machos do biotério da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro foram mantidos no biotério de experimentação em ciclo claro-escuro de 12 h (07:00 às 19:00), com temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ do desmame até atingirem 250 – 300g. Ao atingirem o peso os animais foram divididos em dois protocolos experimentais, propranolol e adrenalectomia, como descritos posteriormente e transferidos para sala de privação de sono. Todo o protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética e bem estar animal da UFRRJ, processo N°. 003-2015

4.3.1. Protocolo propranolol

Os animais foram divididos em 6 grupos: 1- controle (C), com padrão de sono normal; 2- controle tratado com propranolol (C+P); 3-Privados de sono por 24 horas (P24); 4-privados de sono por 24 horas com rebote (P24R); 5- privado de sono por 24 horas e tratado com propranolol (P24+P) e 6- privado de sono por 24 horas com sono rebote de 24 horas (P24R+P). Todos os animais foram gavados por 14 dias antes da privação de sono e durante a privação de sono com benzoato de propranolol na dose 30mg/Kg ou com água no grupo controle (n =7-9).

4.3.2. Protocolo adrenalectomia

Neste protocolo os animais foram distribuídos em 10 grupos: 1- Falso operado (FO), que passa pelo estresse cirúrgico, mas as adrenais não são retiradas, e o padrão de sono é normal; 2- adrenalectomizado com padrão de sono normal (Ax); 3- Privados de sono por 24 horas (P24); 4- Privados de sono por 24 horas com sono rebote de 24 horas (P24R); 5-

adrenalectomizado e privado de sono por 24 horas (AxP24); 6- adrenalectomizado e privado de sono por 24 horas com sono rebote de 24 horas (AxP24R); 7- privados de sono por 96 horas (P96); 8- Privados de sono por 96 horas com sono rebote de 24 horas (P96R); 9- adrenalectomizado e privado de sono por 96 horas (AxP96) e 10- adrenalectomizado e privado de sono por 96 horas com sono rebote de 24 horas (AxP96R) (n = 7 – 9 por grupo)

Para a realização da adrenalectomia, os animais foram anestesiados com ketamina e xilasina, colocados em decúbito ventral e feita uma incisão dorsal de 1.5 cm imediatamente após a 13^a costela. A musculatura divulsionada em cada lado, as glândulas adrenais foram localizadas na porção cranial dos rins e removidas. A sutura foi feita em dois planos com fio inabsorvível monofilamentoso 3-0 e então os ratos foram realocados nas gaiolas e mantidos por mais 10 dias com solução NaCl 0.9% ad libitum. Após 10 dias da cirurgia os animais foram submetidos à privação de sono.

4.4. T3, T4 e corticosterona

Os níveis séricos de T3 total, T4 total e corticosterona foram analisados através da técnica de radioimunoensaio (RIE) com Kit específico (MP Biomedicals, LLC 13485). Todo procedimento foi realizado de acordo com as especificações do KIT, e expressa em ng/dL para o T3; µg/dL para o T4 e ng/mL para corticosterona.

4.5. 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 anticorpo de coelho anti-TSH murino (1^o Ac). A iodação da molécula de TSH com 125I foi realizada em nosso laboratório, pelo método da cloramina T, conforme previamente descrito (Ortiga, 1992). O RIE foi realizado pelo método do 2^o anticorpo, gentilmente cedido pelo professor

José Antunes Rodrigues USP-RP, com adição de 6% de polietilenoglicol, a detecção da radiação foi realizada em cintilador de fase sólida Wizard (2470 Wallac Wizard™ automatic gamma counter). O TSH sérico foi expresso em ng/mL

4.6. Atividade da D1

A glândula tireoide ou 40 mg de fígado 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 ul foram guardadas separadamente a -20°C para dosagem de proteínas (ptn) pelo método de Bradford (1976).

O traçador radioativo foi purificado em virtude das desiodações 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 H₂O/g de gel seco) para se obter somente o ¹²⁵I rT3 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 rT3 marcado foi diluída em 12 ml de H₂O destilada e aplicada à coluna, seguindo uma lavagem com 6 ml de H₂O destilada. Os eluatos foram desprezados contendo radioiodeto e o rT3 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 (1470 Wallac Wizard™ automatic gama 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 30mg de fígado ou tireoide foi incubado em duplicata, por 3 horas a 37°C com 1nM de ¹²⁵I rT3, e 20 mM de DTT em 100 mM

tampão fosfato contendo 1mM de EDTA em volume final de 300 μ l, 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 μ l de soro fetal bovino (Cultilab, BR) gelado e 100 μ l 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 μ l do sobrenadante foram transferidos para tubos de contagem a detecção da radiação foi realizada em cintilador de fase sólida Wizard (2470 Wallac WizardTM automatic gamma counter). A atividade da enzima foi expressa em pmoles rT3/min.mg ptn.

4.7. Atividade da D2

A glândula hipófise ou 40 mg de BAT 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 μ l foram guardadas separadamente a -20°C para dosagem de proteínas (ptn) pelo método de Bradford (1976).

O traçador radioativo foi purificado em virtude das desiodações 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 H₂O/g de gel seco) para se obter somente o ¹²⁵I T₄ radioativo presente na solução, com atividade específica de 1210 μ Ci/ μ g (44,8 MBq/ μ g) (Perkin Elmer Life Sciences, Inc., Boston, MA). Uma alíquota de 70 μ l do T₄ marcado foi diluída em 12 ml de H₂O destilada e aplicada à coluna, seguindo uma lavagem com 6 ml de H₂O destilada. Os eluatos foram desprezados contendo radioiodeto 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 μ l para contagem da radiação gama no contador Wizard (1470 Wallac WizardTM automatic gama counter). Os tubos com mais de 5.000 cpm/5 μ l 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 BAT foi incubado em duplicata, por 3 horas a 37°C com 1nM de 125IT4, 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 a detecção da radiação foi realizada em cintilador de fase sólida Wizard (2470 Wallac Wizard™ automatic gamma counter). A atividade da enzima D2 foi expressa em fmoles T4/min.mg ptn.

4.8. Atividade das enzimas antioxidante

As amostras de tireoide foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 5 mM (pH 7,4), contendo 0,9% de NaCl (p / v) e 1mM EDTA, seguido de centrifugação a $750 \times g$ durante 10 minutos a 4 ° C. As alíquotas de sobrenadante foram armazenado a -70 ° C. A atividade da catalase foi realizada pelo método de Aebi e foi expressa como unidades por miligrama de Proteína (U.mg-1). Atividade da glutathione peroxidase (GPX) foi realizada seguindo a oxidação de NADPH a 340 nm em presença de um excesso de glutathione redutase, a redução da Glutathione e hidróperóxido de terc-butilo como substratos, e expressa como nmol de NADPH oxidado por miligrama de proteína (nmol.mg-1). A atividade total de superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela redução do citocromo C a 550 nm e expressa em micromol/min/mg de ptn.

4.9. 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 $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Protocolo Propranolol

✓ T4 e T3

O T4 diminuiu significativamente nos grupos P24 ($3,9 \pm 0,2$ ng/dL), P24+P ($3,9 \pm 0,6$ ng/dL) e P24R+P ($3,8 \pm 0,3$ ng/dL) em relação aos grupos C ($6,1 \pm 0,3$ ng/dL) e C+P ($6,0 \pm 0,3$ ng/dL). O T3 aumentou significativamente nos grupos P24 ($124,4 \pm 6,1$ ng/dL) e P24R ($105,2 \pm 4,0$ ng/dL) comparados ao C ($74,6 \pm 5,5$ ng/dL) e ao C+P ($64,7 \pm 7,5$ ng/dL) (Figura 7).

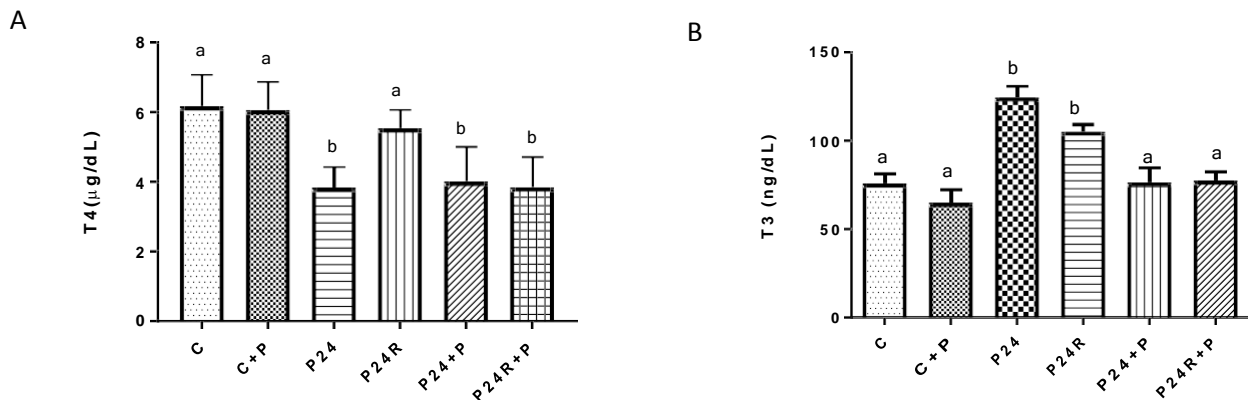


Figura 7. Níveis séricos de T4 (A) e de T3 (B) nos grupos: controle (C); controle tratado com propranolol (C+P); privados de sono por 24 horas (P24); privados de sono por 24 horas com rebote (P24R); privados de sono por 24 horas tratado com propranolol (P24+P) e privados de sono por 24 horas com rebote e tratado com propranolol (P24R+P). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

✓ Iodotironina desiodase tipo 1 (D1)

Na tireoide, a atividade da D1 diminuiu apenas no grupo P24 ($143,5 \pm 5,2$ pmoles rT3/min.mg.ptn) comparados ao controle ($171,9 \pm 2,7$ pmoles rT3/min.mg.ptn). No fígado a D1 aumentou nos grupos C+P ($200,5 \pm 5,3$ pmoles rT3/min.mg.ptn), P24 ($184,4 \pm 0,53$ pmoles rT3/min.mg.ptn), P24R ($181,7 \pm 1,06$ pmoles rT3/min.mg.ptn), P24+P ($179,0 \pm 3,2$ pmoles rT3/min.mg.ptn) e P24R+P ($184,4 \pm 0,5$ pmoles rT3/min.mg.ptn), todos em relação ao controle ($106,6 \pm 7,2$ pmoles rT3/min.mg.ptn) como demonstrado na figura 8.

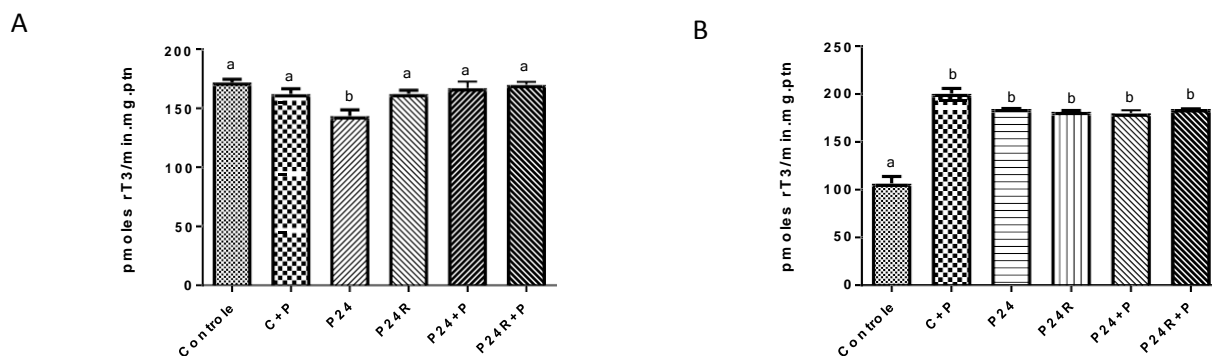


Figura 8. Atividade da iodotironina desiodase tipo 1 na tireoide (A) e no fígado (B) nos grupos: controle (C); controle tratado com propranolol (C+P); privados de sono por 24 horas (P24); privados de sono por 24 horas com rebote (P24R); privados de sono por 24 horas tratado com propranolol (P24+P) e privados de sono por 24 horas com rebote e tratado com propranolol (P24R+P). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

✓ Iodotironinas desiodase tipo 2 (D2)

No TAM a atividade da D2 aumentou no grupo P24 ($7,8 \pm 1,1$ fmoles T4/min.mg.ptn) e no P24+P ($12,9 \pm 1,8$ fmoles T4/min.mg.ptn) em relação ao grupo controle ($0,4 \pm 0,07$ fmoles T4/min.mg.ptn). Na hipófise a D2 aumentou no grupo P24 ($2,3 \pm 0,1$ fmoles T4/min.mg.ptn) e P24R+P ($3,4 \pm 0,5$ fmoles T4/min.mg.ptn) relacionado ao controle ($1,4 \pm 0,2$ fmoles T4/min.mg.ptn). No hipotálamo a D2 diminuiu nos grupos C+P ($1,2 \pm 0,05$ fmoles T4/min.mg.ptn), P24 ($0,7 \pm 0,11$ fmoles T4/min.mg.ptn) e P24+ P ($0,9 \pm 0,04$ fmoles T4/min.mg.ptn) em relação ao controle ($2,0 \pm 0,2$ fmoles T4/min.mg.ptn (Figura 9).

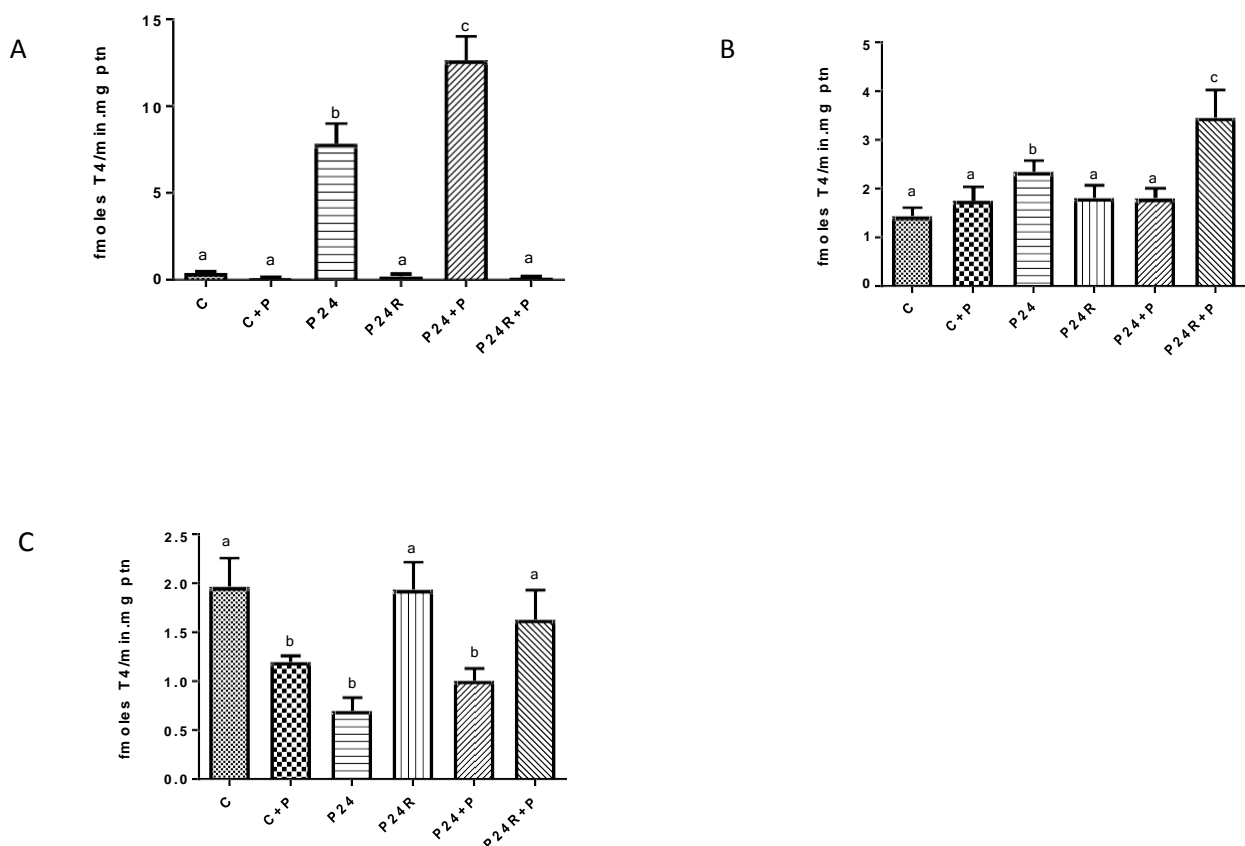


Figura 9. Atividade da iodotironina desiodase tipo 2 no tecido adiposo marrom (A), na hipófise (B) e no hipotálamo (C) nos grupos: : controle (C); controle tratado com propranolol (C+P); privados de sono por 24 horas (P24); privados de sono por 24 horas com rebote (P24R); privados de sono por 24 horas tratado com

propranolol (P24+P) e privados de sono por 24 horas com rebote e tratado com propranolol (P24R+P). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

5.2. Protocolo adrenalectomia

✓ Privação de sono por 24 horas

✓ *Corticosterona*

Os níveis séricos de corticosterona diminuiram nos grupos Ax ($109,3 \pm 40,8$ ng/mL), AxP24 ($175,6 \pm 34,7$ ng/mL) e AxP24R ($95,6 \pm 20,8$ ng/dL) em relação ao FO ($352,7 \pm 40,8$ ng/mL) como demonstrado na figura 10.

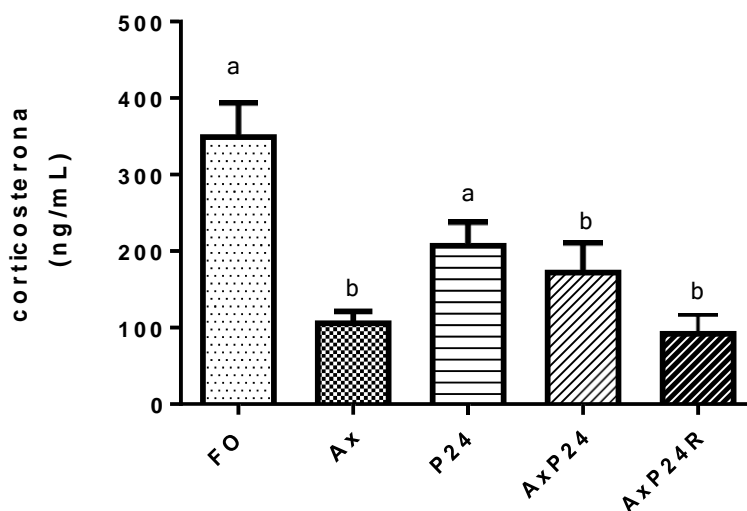


Figura 10. Níveis séricos de corticosterona nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24h (P24) adrenalectomizados privado de sono por 24 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

5.2..1. T3 e T4

O T3 aumentou apenas nos grupos P24 ($120,1 \pm 5,6$ ng/dL) e P24R ($108,6 \pm 3,9$ ng/dL) em relação ao FO ($53,3 \pm 4,7$ ng/dL). O T4 diminuiu nos grupos Ax ($4,1 \pm 0,2$ µg/dL), P24 ($3,8 \pm 0,16$ µg/dL), AxP24 ($2,9 \pm 0,3$ µg/dL) e AxP24R ($2,4 \pm 0,3$ µg/dL) em relação à FO ($5,3 \pm 0,3$ µg/dL) como demonstrado na figura 11.

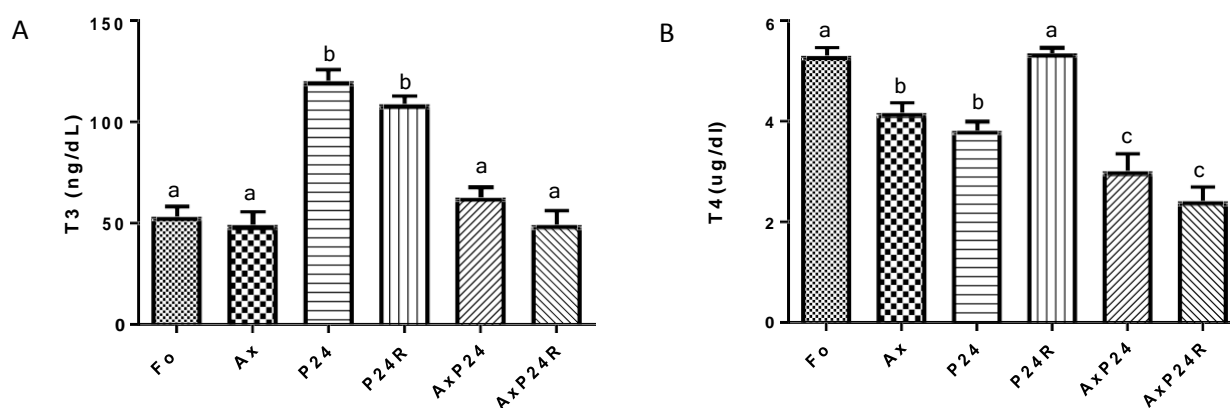


Figura 11. Níveis séricos de T3 (A) e de T4 (B) nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24 h (P24), privados de sono por 24 h com rebote (P24R), adrenalectomizados privado de sono por 24 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

5.2..2. TSH

O TSH sérico só aumentou no grupo Ax ($2,8 \pm 0,5$ ng/mL) em relação ao grupo FO ($1,4 \pm 0,3$ ng/mL), e também houve uma diminuição no Ax P24 ($1,1 \pm 2,3$ ng/mL) e no AxP24R ($0,8 \pm 2,7$ ng/mL) em relação ao Ax como demonstrado na figura 12.

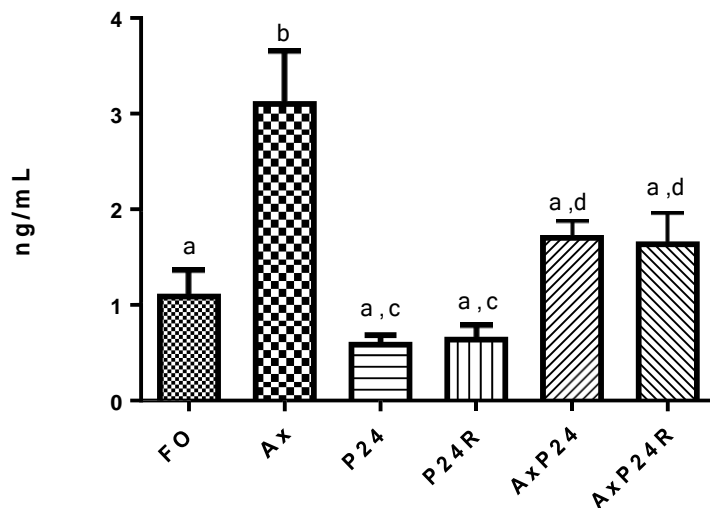


Figura 12. Níveis séricos de TSH nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24 h (P24), privados de sono por 24 h com rebote (P24R), adrenalectomizados privado de sono por 24 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

✓ **Privação de sono por 96 horas**

5.2..1. Corticosterona

Os níveis séricos de corticosterona diminuiram no grupo Ax ($12,1 \pm 7,5$ mg/mL) e AxP24R ($23,6 \pm 3,1$ mg/mL) em relação ao FO ($38,5 \pm 7,5$ mg/mL) e aumentou nos grupos P96 ($255 \pm 77,4$ mg/mL) e P96R ($227,7 \pm 19,3$ mg/mL) também em relação ao FO como demonstrado na figura 13.

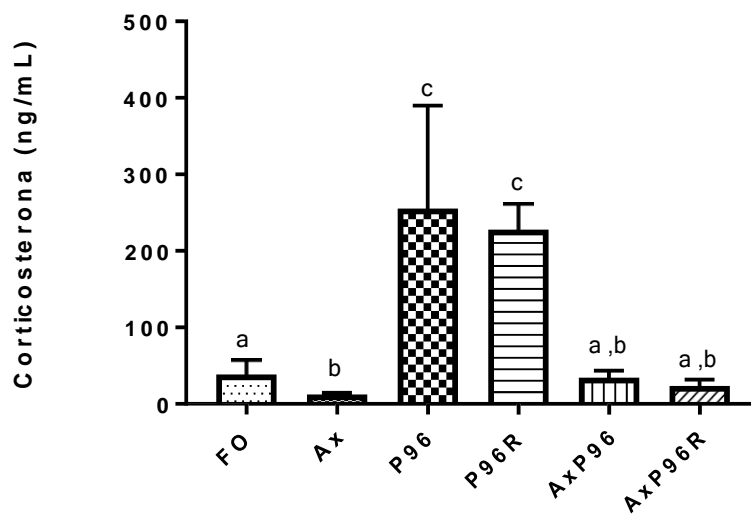


Figura 13. Níveis séricos de corticosterona nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 96 horas (P96), privados de sono por 96 horas com rebote (P96R), adrenalectomizados privado de sono por 96 horas (AxP96) e adrenalectomizados privado de sono por 96 horas com rebote (AxP96R). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

5.2..2. T3 e T4

O T3 aumentou nos grupos P96 ($116,9 \pm 3,4$ ng/dL), P96R ($117,8 \pm 2,6$ ng/dL) e diminuiu nos grupos AxP96 ($24,1 \pm 4,8$ ng/dL) e AxP96R ($20,6 \pm 2,4$ ng/dL) em relação ao FO ($47,7 \pm 2,8$ ng/dL) e ao Ax ($53,9 \pm 5,0$ ng/dL). O T4 diminuiu nos grupos Ax ($3,9 \pm 0,4$ μg/dL), P96 ($4,3 \pm 0,34$ μg/dL), P96R ($4,3 \pm 0,24$ μg/dL), AxP96 ($2,3 \pm 0,24$ μg/dL) e AxP96R ($1,9 \pm 0,24$ μg/dL) comparados ao FO ($5,3 \pm 0,14$ μg/dL)

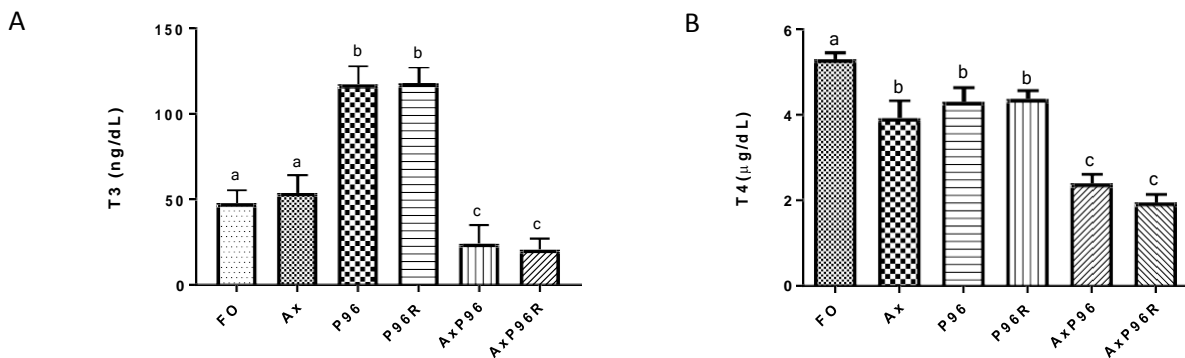


Figura 14. . Níveis séricos de T3 (A) e de T4 (B) nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 96 h (P96), privados de sono por 96 h com rebote (P96R), adrenalectomizados privado de sono por 96 horas (AxP96) e adrenalectomizados privado de sono por 96 horas com rebote (AxP96R). Letras diferentes identificam médias que diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si.

5.3. Enzimas antioxidantes

✓ Glutationa peroxidase

Não houve diferença significativa em nenhum dos grupos estudados em relação à atividade da glutaciona peroxidase (GPX) na glândula tireoide.

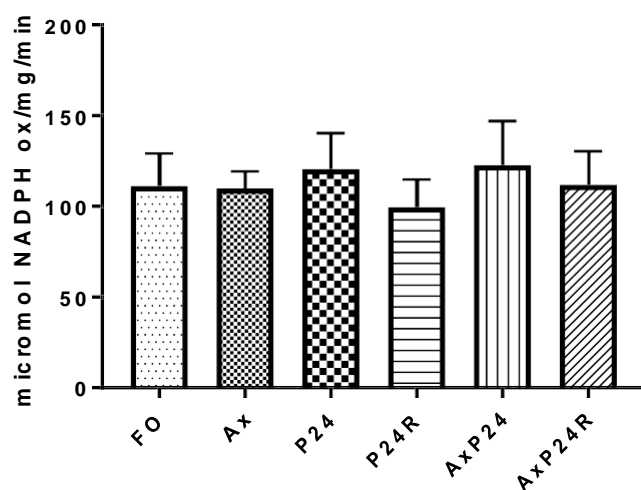


Figura 15: atividade da glutaciona peroxidase nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24 h (P24), privados de sono por 24 h com rebote (P24R), adrenalectomizados privado de sono por 96 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R).

✓ **Catalase**

Não houve diferença significativa em nenhum dos grupos estudados na atividade da catalase na tireoide.

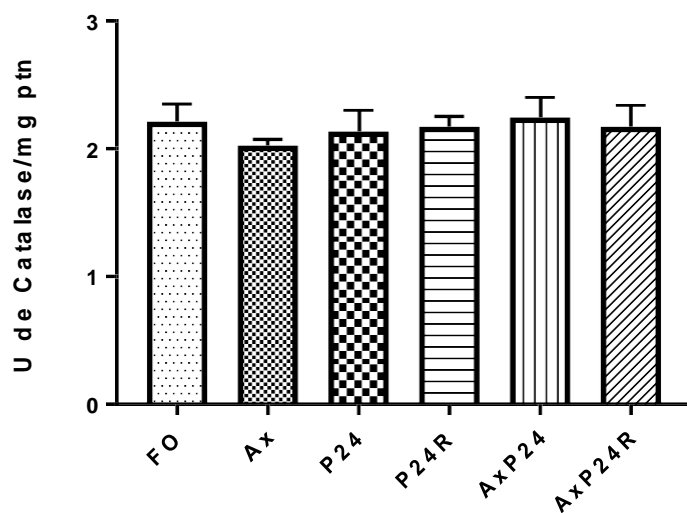


Figura 16: atividade da catalase nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24 h (P24), privados de sono por 24 h com rebote (P24R), adrenalectomizados privado de sono por 96 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R).

✓ **Superóxido dismutase**

Com relação à atividade da superóxido dismutase (SOD) na tireoide, também não observamos nenhuma diferença significativa grupos estudados.

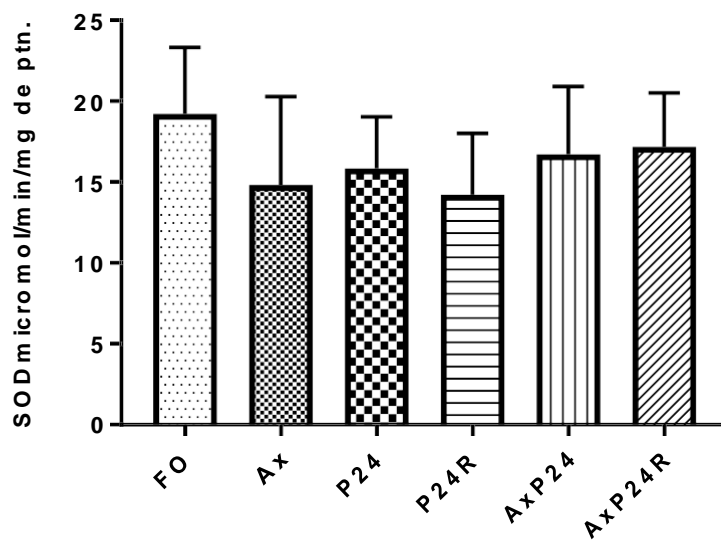


Figura 17: atividade da superóxido dismutase nos grupos: falso operado (FO), adrenalectomizados (Ax), privados de sono por 24 h (P24), privados de sono por 24 h com rebote (P24R), adrenalectomizados privado de sono por 96 horas (AxP24) e adrenalectomizados privado de sono por 24 horas com rebote (AxP24R).

6. DISCUSSÃO

6. Discussão

Muitos trabalhos relacionam inúmeros tipos de estresses e suas influências na função tireoidiana, o objetivo é entender melhor o mecanismo de *feedback* negativo que regula o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (olivares et al., 2011). Alguns estudos demonstram que tanto o fator estressor, quanto a duração, se relacionam com alterações da função tireoideia, no entanto estes estudos são controversos, por exemplo, Takanuve et al. (1994) demonstraram que estresse por choque leva à diminuição dos níveis séricos dos hormônios tireoideos, por outro lado este mesmo protocolo causou um aumento destes hormônios no trabalho de Cizza et al., (1996).

A metodologia das plataformas múltiplas de privação de sono paradoxal é considerada uma metodologia de estresse devido a ativação de sistemas clássicos resultando na secreção de hormônios do estresse como a corticosterona (Coenen & van Luijtelaar, 1985; Patchev et al., 1991; Suchecki et al., 2002; Andersen et al., 2004 e 2005) e catecolaminas (Farooqui et al., 1996; Andersen et al., 2005). Fadda e Fratta (1997) relataram aumento dos níveis de CRH no corpo estriado, áreas límbicas e na pituitária e redução no hipotálamo após 72 h de privação de sono paradoxal. Estes resultados indicam uma possível ativação do eixo HPA, cujo aumento dos níveis de CRH pode estimular a secreção de corticosterona. A privação de sono é capaz de alterar o eixo HPA e estudos tem demonstrado a relação deste com o eixo hipotálamo-hipofise-tireoide (HPT, do inglês: hypothalamic-pituitary-thyroid). Diversos trabalhos sugerem que o estresse pode induzir redução dos HT, porém os resultados não são conclusivos diante das diferentes metodologias utilizadas.

Em nosso trabalho observamos, como esperado, a diminuição dos níveis séricos de corticosterona em ratos adrenalectomizados e nos animais adrenalectomizados privados de sono paradoxal por 24 horas. No entanto, surpreendentemente, a privação de sono por 96 horas normalizou a diminuição deste hormônio em relação aos animais falso-operados. Este aumento pode estar relacionado a um possível aumento da testosterona como já descrito por Andersen (2005), que pode ter uma reação cruzada com o anticorpo do KIT, segundo o fabricante.

Poucos trabalhos relacionam a privação de sono com a função tireoidiana. Em relação ao T4, parece que a diminuição deste hormônio é independente da metodologia e/ou tempo de privação. Everson e colaboradores (2004) e Baumgartner e colaboradores (1986), observaram uma diminuição dos níveis séricos de T4 pela metodologia dos discos giratórios. Um estudo recente do nosso grupo, utilizando a metodologia das plataformas múltiplas, também observou a diminuição de T4 em ratos intactos (Rodrigues et al., 2015). Nascimento e colaboradores (2014) observaram uma diminuição do T4 em ratas ovariectomizadas, já em ratas intactas o T4 não diminuiu, o que pode ser explicado pela presença do estradiol, conhecido por modular positivamente a liberação dos hormônios tireóideos, observado em ratas intactas e privadas de sono paradoxal por 24 e 96 horas (Andersen et al., 2005).

Neste trabalho, também observamos a diminuição do T4 no protocolo de animais tratados com propranolol e no protocolo de animais adrenalectomizados, todos privados de sono por 24 e 96 horas. Essa diminuição do T4 parece não estar relacionada à síntese deste hormônio, uma vez que anteriormente demonstramos que não houve diferença significativa na atividade do NIS e da TPO *in vivo* (Rodrigues et al., 2015), nem à atividade das enzimas antioxidantes na tireoide, uma vez que neste trabalho não observamos diferença significativa na atividade da GPX, da catalase e da SOD. Lugato e colaboradores (2013) observaram aumento da expressão da SOD em esplenócito após 72 horas de privação de sono paradoxal, o que não foi detectado por nós quando avaliamos a atividade da SOD na glândula tireoide após 24h de PSP, o que pode ser explicado pelo tempo diferente de pricação de sono.

Os dados em relação ao T3 e ao TSH são contraditórios, 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 utilizando a metodologia dos discos giratórios. Já na metodologia das plataformas múltiplas nós observamos um aumento do T3 em ratos machos intactos (Rodrigues et al., 2015). Em fêmeas, Nascimento e colaboradores (2014) observaram um aumento do T3 em ratas intactas e privadas de sono paradoxal, já em ratas ovariectomizadas, o T3 diminuiu após a privação de sono, eles relacionaram esta

diminuição do T3 à diminuição da atividade da D1 no fígado, diminuindo a conversão de T4 em T3.

A desidase tipo 1 é conhecida classicamente como a principal enzima responsável pela geração e manutenção do T3 plasmático (Gerebem et. al., 2005). Neste trabalho, o T3 não sofreu alteração em animais tratados com propranolol, que pode ser explicado pelo aumento da atividade da D1 no fígado. Em ratos adrenalectomizados e privados de sono por 24 horas, o T3 também não diminuiu apesar do T4 ter diminuído, reforçando a ideia que a privação de sono leva a uma falha no mecanismo de *feedback* negativo, uma vez que em ratos adrenalectomizados o T4 e o TSH estão diminuídos mas os níveis séricos do T3 se mantêm inalterados, possivelmente por um aumento das iodotironinas desidases periféricas.

Em relação aos esteróides sexuais masculinos, foram feitos poucos estudos avaliando doses suprafisiológicas desses hormônios na função tireoidea, possivelmente pela prevalência de disfunção tireoidiana em mulheres. Em 1993, Deyssig & Weissel demonstraram que, num pequeno grupo de 5 halterofilistas fazendo uso de esteróides anabolizantes, as concentrações de T4 e T3 totais e TBG estavam diminuídas em relação ao grupo controle. Alen e cols. conduziram um estudo no qual, sete atletas de elite foram monitorados por doze semanas em relação à sua função tireoidea, enquanto consumiam quatro tipos diferentes de esteróides anabólicos e eles observada diminuição no T4 e T3, essas doses suprafisiológicas de andrógenos corroboram com os dados de Andersen e colaboradores (2005) que observaram que a privação de sono paradoxal leva à um aumento dos níveis de testosterona.

Neste trabalho nós observamos um aumento do T3 em ratos intactos, mas tanto o tratamento com propranolol quanto a adrenalectomia normalizaram este aumento após 24 horas de privação de sono. No entanto, após 96 horas de privação de sono nós observamos que os T3 em ratos adrenalectomizados diminuiu em relação ao falso operado.

A atividade D2 é diretamente modulada pela atividade adrenérgica, onde um aumento da ativação simpática leva um aumento da conversão periférica de T4 em T3, principalmente no TAM por aumento da atividade desta enzima (Bianco, 2005).

Balzano et al. (1990), utilizando a metodologia das plataformas giratórias, analisaram a atividade da desidase 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 em ratos intactos (Rodrigues et al., 2015) o que tínhamos associado a um possível aumento da estimulação adrenérgica.

No entanto, neste trabalho a atividade D2 dos animais tratados com propranolol também aumentou no TAM, porém este aumento não foi seguido de um aumento do T3 como observado em animais intactos, mas sim de uma diminuição do T4. Este aumento da atividade da D2 no TAM em animais tratados com propranolol pode ser devido ao mecanismo de ubiquitinação, intrínseco da cinética desta enzima, uma vez que na presença de níveis séricos de T4 normais, esta enzima é inativada em cerca de 20 minutos, e a diminuição do T4 pode prorrogar a atividade desta enzima por horas (Gerebem B., 2008). Por outro lado, também pode estar relacionado com um aumento da regulação de uma ou mais isoformas dos receptores β -adrenérgicos, pois animais knockdown para receptores β -2 adrenérgicos no TAM apresentam um aumento do RNAm de receptores β -1 e receptores β -3 no TAM em animais expostos ao frio (Fernandes et al., 2014).

Em geral, inúmeros fatores de estresse leva a um aumento da liberação de glicocorticoides que já é conhecido por levar à uma diminuição da liberação de TSH e conseqüentemente diminuição da liberação dos hormônios tireoidianos, podendo assim ser diagnosticado como hipotireoidismo secundário.

Nossos resultados mostram que a adrenalectomia não impediu a diminuição dos níveis séricos de T4, sugerindo que a hipotiroxinemia é causada pela privação de sono paradoxal independentemente de uma hiperativação da glândula adrenal.

A adrenalectomia levou a um aumento dos níveis séricos de TSH, corroborando com Sarria e colaboradores (1994), que também observaram um aumento do TSH em ratos adrenalectomizados. 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 privação de sono normalizou o TSH elevado observado em ratos adrenalectomizados com padrão de sono normal.

Nosso grupo também observou uma diminuição dos níveis séricos de TSH em machos e fêmeas intactos e privados de sono (Rodrigues et al., 2015; Nascimento et al., 2014), o que nos leva a crer que a privação de sono causa uma alteração no mecanismo de *feedback* negativo que controla o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, uma vez que a diminuição do T4 que ocorreu também em ratos adrenalectomizados e privados de sono não foi capaz de estimular o aumento da secreção de TSH.

Em nosso estudo o T3 sérico não sofreu alteração em ratos adrenalectomizados e privados de sono por 24 horas, porém em ratos adrenalectomizados e privados de sono por 96 horas o T3 diminuiu, podendo estar associado a um possível aumento da testosterona, como observado por Andesen e colaboradores (2005). Nos animais tratados com propranolol, a manutenção do T3 pode estar associada ao aumento da atividade das desidases tipo 1 e/ou tipo 2, podemos sugerir esse mesmo mecanismo no protocolo da adrenalectomia, no entanto não avaliamos estas atividades até o momento.

7. CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados podemos concluir que a privação de sono paradoxal leva à diminuição do T4 independente de uma hiperativação da glândula adrenal, pois os níveis séricos deste hormônio diminuíram em ratos adrenalectomizados e privados de sono por 24 e 96 horas. O bloqueio β adrenérgico também não foi eficaz na manutenção dos níveis séricos deste hormônio, pois também observamos a diminuição do T4 nos animais tratados com propranolol.

Também podemos concluir que a privação de sono leva a uma falha no mecanismo de *feedback* negativo, pois como o esperado, a adrenalectomia eleva os níveis de TSH mas a privação de sono em animais adrenalectomizados mantém os níveis de TSH iguais aos níveis dos animais falso-operados; ou seja, os níveis diminuídos do T4 em ratos adrenalectomizados não são capazes de estimular um aumento da secreção de TSH em ratos adrenalectomizados e privados de sono paradoxal por 24 horas.

Nossos dados nos leva a crer que o T3 não sofreu alteração devido ao aumento da conversão periférica deste hormônio pela elevada atividade das iodotironinas desidases tipo 1 e 2, como observamos no protocolo do propranolol, e na privação por 96 horas houve uma diminuição dos níveis de T3, sendo necessários estudos posteriores dos níveis de testosterona e da atividade das desidases nos animais adrenalectomizados para esclarecermos melhor esses efeitos da privação de sono na função tireoidea.

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

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.

Carol A. Everson¹ and Thaddeus S. Nowak, JR.² 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

Rodrigo Soares Fortunato¹ William M.O. Braga, Victor H. Ortenzi, Deivid C. Rodrigues³ Bruno Moulin Andrade, Leandro Miranda-Alves, Edson Rondinelli, Corinne Dupuy, Andrea Claudia Freitas Ferreira, and Denise P. Carvalho. Sexual Dimorphism of Thyroid Reactive Oxygen Species production Due to Higher NADPH Oxidase 4 Expression in Female Thyroid Glands. *THYROID*,23; 1, 2013

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.

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

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.

Nascimento CP. Estudo da função tireoidea, metabolismo extratireoideo das iodotironinas e papel dos hormônios gonadais femininos em ratas submetidas à privação de sono paradoxal. Dissertação de mestrado; 2012.

Nayana Coutinho Rodrigues, Natália Santos da Cruz, Cristine de Paula Nascimento, Rodrigo Rodrigues da Conceição, Alba Cenélia Matos da Silva, Emerson Lopes Olivares and Michelle Porto Marassi. Sleep deprivation alters thyroid hormone economy in rats. *Exp Physiol* 100.2 (2015) pp 193-202

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* 4th Edition 2000 (ed) Eric R. Kandel

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.

50

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

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