

**EFEITOS DA PRIVAÇÃO DO SONO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E DE DANO OXIDATIVO A LIPÍDIOS EM TECIDO
MUSCULAR, CARDÍACO, RENAL E HEPÁTICO DE RATOS**

Patrícia C. Silva^{1,2}, Gustavo C. Dal-Pont¹, Fernanda F. Gava¹, Samira S.
Valvassori^{1,2*}

¹Laboratório de Psiquiatria Translacional, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, Av. Universitária, 1105, sala 6-S, CEP: 88806-000, Universitário, Criciúma, Santa Catarina, Brasil

²Curso de Fisioterapia, UNESC, Av. Universitária, 1105, sala 6-S, CEP: 88806-000, Universitário, Criciúma, Santa Catarina, Brasil

*Autor correspondente: Dra. Samira S. Valvassori, Msc. PhD. Laboratório de Psiquiatria Translacional, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, UNESC, Av. Universitária, 1105, sala 6-S, CEP: 88806-000, Universitário, Criciúma, Santa Catarina, Brasil. Telefone +55 (48)34312792. E-mail: samiravalvassori@unesc.net.

Resumo

Alguns estudos demonstram que o sono tem propriedades moduladoras do metabolismo muscular e a privação de sono paradoxal (PSP) pode levar a atrofia muscular. Além disso, o sono prejudicado pode levar a danos em órgãos de uma forma geral. É bem descrito na literatura que a PSP induz alterações comportamentais e dano oxidativo a biomoléculas cerebrais. O objetivo do presente estudo é avaliar parâmetros comportamentais e parâmetros de estresse oxidativo no músculo, coração e rim e fígado de ratos submetidos à PSP. Para esse fim, ratos *Wistar* machos, foram submetidos à PSP durante 72h. Após o período de PSP, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto para a avaliação da atividade locomotora e da exploratória, do comportamento estereotípico, do comportamento de risco e do comportamento do tipo ansioso. O músculo femoral foi dissecado, bem como o coração, o rim e o fígado para a avaliação de peroxidação lipídica. Os resultados mostraram que a PSP induziu hiperatividade, comportamento de risco, e comportamento do tipo ansiolítico nos ratos. Além disso, a PSP induziu dano oxidativo a lipídio no rim dos animais. Portanto, pode ser concluído que a PSP, além de induzir alteração comportamental nos animais, pode também induzir dano oxidativo no sistema renal.

Palavras-chave: privação do sono; comportamento de risco; hiperatividade; estresse oxidativo.

Abstract

Some studies have demonstrated that sleep has muscular metabolism properties and that sleep deprivation (PSD) can lead to muscular atrophy. Besides, poor sleep can induce injury to organs in general. It is well described in the literature that PSD causes behavioral alterations and oxidative damage to cerebral biomolecules. The goal of the present study is to evaluate parameters of behavior and oxidative stress in muscle, heart, kidney and liver of rats submitted to PSD. Therefore, male Wistar rats were subjected to PSD for 72 hours. After PSD, the animals were submitted to the open-field test for the evaluation of locomotor activity, exploratory activity, stereotypic behavior, risk behavior and anxiety behavior. The femoral muscle was dissected, as well as heart, kidney and liver for lipid peroxidation. The results showed that PSD induces hyperactivity, risk-like behavior, and anxiolytic-like behavior in rats. Besides, PSD induced oxidative damage in the kidney of the rats. Therefore, it could be concluded that PSD, besides to induce behavioral alterations, also induces oxidative damage to the renal system.

Key-words: sleep deprivation; risk-like behavior; hyperactivity; oxidative stress

Introdução

O sono é de fundamental importância para o descanso do organismo e possui basicamente duas fases, com mecanismos fisiológicos distintos: sono lento (não REM) e sono paradoxal (REM).¹ A remoção parcial ou supressão do sono em um organismo é conhecida como privação de sono paradoxal (PSP).² É bem descrito na literatura que a PSP pode levar a alterações comportamentais importantes, como: ansiedade, comportamentos do tipo maníaco e depressão.^{3,4} O modelo animal de PSP em ratos tem sido utilizado como uma importante ferramenta para o estudo de alterações comportamentais e bioquímicas induzidas por transtornos do sono.^{5,6} Além de causar alterações importantes ao sistema nervoso central (SNC), autores descrevem que a PSP pode prejudicar também de forma significativa o organismo, incluindo o sistema muscular, o cardíaco o renal e o hepático.^{7,8,9}

O sono tem sido apontado como modulador do metabolismo muscular e a PSP pode levar a alterações que levam à atrofia muscular.^{7,10,11} Apesar de estudos sobre esse tema serem preliminares, já é apontado a relevância clínica da PSP em pacientes hospitalizados, em trabalhadores noturnos, na medicina dos esportes e na recuperação do músculo após lesão.^{12,13,14} No músculo, o ambiente catabólico induzido pela PSP é caracterizada pelo aumento da atividade do eixo hipotálamo / hipófise / adrenal (HPA)¹⁵ liberação de fatores pró-inflamatórios¹⁶ e redução da concentração de hormônios anabólicos¹⁷ como fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), testosterona e hormônio do crescimento (GH), que são fatores-chaves no processo de regeneração de lesão muscular.^{18,19}

Em relação ao sistema cardiovascular, o sono é um regulador vital de funções desse sistema, tanto no estado fisiológico quanto nas doenças.⁸ Os distúrbios do sono exercem efeitos nocivos em vários sistemas, com alterações nas vias endócrina, metabólica e imune, relacionadas a desfechos de saúde desfavoráveis, como: diabetes, hipertensão e obesidade, que contribuem para o desenvolvimento de doença cardiovascular.^{20,21} Existem alguns estudos associando o aumento do risco de arritmias cardíacas em indivíduos privados de sono. Além disso, tem sido relatado que a PSP pode contribuir para o desenvolvimento ou a recorrência de arritmias.^{22,23}

O sistema renal também se mostra fortemente prejudicado com a PSP. A maioria dos processos fisiológicos renais segue um ritmo diurno, incluindo a regulação do sistema renina-angiotensina, reabsorção de sódio, fluxo sanguíneo

renal, filtração glomerular e fração de filtração, sendo assim 13% da transcrição gênica do rim é diurna.^{24,25} A coordenação da periodicidade circadiana destes processos permite que o rim antecipe mudanças no metabolismo e demandas fisiológicas ao longo de um ciclo de 24 horas. Contudo, um estudo prévio demonstrou que a diminuição da quantidade de sono e o trabalho noturno estão associados com fatores de risco para as doenças renais crônicas (DRC).⁹

Uma das teorias que pode explicar os danos induzidos pela PSP, tanto no sistema nervoso central quanto na periferia, é o estresse oxidativo.⁶ Em situações em que a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) excede a capacidade de defesa antioxidante, uma condição chamada de estresse oxidativo, torna as biomoléculas vulneráveis a danos, podendo levar a célula a apoptose.²⁶ Os marcadores de estresse oxidativo têm sido amplamente utilizados para o estudo do papel desse sistema em diversas doenças.^{27,28} Um dos marcadores de estresse oxidativo amplamente utilizado nas pesquisas é a avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA), o qual é um dos produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação.²⁹

Estudos prévios mostram que a PSP induz alterações comportamentais e dano oxidativo a lipídeos, a proteína e ao DNA cerebral de camundongos.⁴ Além disso, Everson e colegas¹⁷ (1994) demonstraram que o sono possui propriedades antioxidantes, levando a hipótese de que a PSP pode gerar estresse oxidativo. O papel do estresse oxidativo no SNC induzido pela PSP já está bem descrito na literatura.^{6,4} Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da PSP sobre o estresse oxidativo no coração, músculo, rim e fígado. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar parâmetros comportamentais e dano oxidativo a lipídios no músculo, coração, rim e fígado de ratos submetidos à PSP.

Metodologia

Animais

Este estudo enquadra-se no modelo de delineamento denominado pesquisa experimental. Foram utilizados 20 ratos *Wistar* adultos com aproximadamente 60 dias, pesando entre 300 a 350g provenientes do biotério da UNESC. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (41x34x16 cm), 5 ratos por caixa, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00h às 19:00h), recebendo comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de 23 + 1°C. Todos os

procedimentos com os animais só iniciaram após a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa para o Uso de Animais (CEUA), protocolo 012/2018-2.

Modelo Animal de Privação do Sono

Para o modelo animal de PSP foram utilizados ratos *Wistar* adultos, com aproximadamente 60 dias. Os animais foram alocados em cada caixa (60x50x22 cm) contendo 9 plataformas com 7cm de diâmetro cada. O fundo da caixa foi preenchido com uma lâmina d'água de 3 cm de profundidade fazendo com que os animais se obriguem a permanecer nas plataformas, podendo se locomover à vontade entre elas. A privação foi somente do sono REM, em que os animais dormem, mas antes de entrarem em sono REM, devido à atonia muscular, caem da plataforma na água obrigando-os a permanecerem acordados. Comida e água foram disponibilizadas à vontade na grade que fica no topo da caixa. Foi adotado o tempo de 72h de privação pelo fato de que é nesse período que ocorrem as alterações comportamentais e, possíveis alterações fisiológicas, nos animais³⁰. Durante o experimento, a sala em que os animais foram alocados foi mantida em um ciclo claro-escuro de 12h (luzes acesas às 07:00h) com temperatura de 23 ± 1 °C. Os animais em privação foram mantidos com aquecedores próximos à caixa para que devido à água a temperatura não baixasse muito e eles sofram com o frio. Os ratos do grupo controle foram expostos às mesmas condições, exceto a água na superfície da caixa que foi substituída por maravalha. Portanto, os grupos experimentais do presente estudo foram 2: 1) Privação do Sono (n = 10) e 2) Controle (n = 10).

Análise Comportamental

Teste do Campo Aberto

Após o período de 72h de PSP os animais foram submetidos ao teste do campo aberto. O teste de campo aberto foi executado em uma caixa de 40x60 cm, cercada por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada, com uma parede de vidro frontal e o assoalho com nove retângulos iguais divididos por linhas pretas. Os animais foram colocados delicadamente no quadrante posterior esquerdo, para que explorassem a arena por 5 minutos. Durante o teste foram contados: 1) os cruzamentos entre as linhas pretas, para a avaliação da atividade locomotora dos

animais; 2) a quantidade de vezes em que o rato ficou apoiado nas patas traseiras a fim de explorar o ambiente, para a avaliação da atividade exploratória dos animais; 3) o número de auto-limpeza dos animais ou *grooming*, para avaliação de comportamentos estereotípicos; 4) o número de limpeza de vibrissas, como um segundo parâmetro de comportamento estereotípico; 5) o número de visitas ao centro do aparato, como parâmetro de comportamento de risco; 6) número de bolo fecal, como parâmetro de ansiedade e; 7) latência para a saída do primeiro quadrante, como um segundo parâmetro de ansiedade.

Análises bioquímicas

Após o término dos testes comportamentais, foi administrado nos animais cloridrato de cetamina 80 mg/kg e xilasina 10 mg/kg intramuscular para que eles estivessem anestesiados no momento em que eles fossem mortos por decapitação. Após a decapitação, o músculo femoral foi dissecado, bem como o coração o rim e o fígado. As amostras foram dissecadas em uma superfície gelada, posteriormente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas no ultrafreezer a -70°C para posterior análise bioquímica.

Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): O kit de TBARS da Cayman permite a quantificação da peroxidação lipídica, através da ligação do TBA ao MDA. O músculo femoral foi dissecado, bem como o coração o rim e o fígado. O aduto formado pela ligação TBA-MDA em altas temperaturas (90-100°C) e em condições ácidas foi mensurado colorimetricamente a 530-540 nm. Foram calculados os valores os valores de MDA para cada amostra a partir de uma curva padrão.

Análise estatística

Todos os gráficos representam média \pm desvio padrão da média. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste t para amostras independentes. A significância estatística considerada foi de $p \leq 0,05$.

Resultados

Como pode ser observado na **Figura 1**, não houve alteração do número de cruzamento dos animais (**1A**), que representa que a PSP não alterou a atividade

locomotora dos animais. Entretanto, a PSP aumentou o número de levantamentos dos animais (**1B**), que representa um parâmetro de hiperatividade nos ratos.

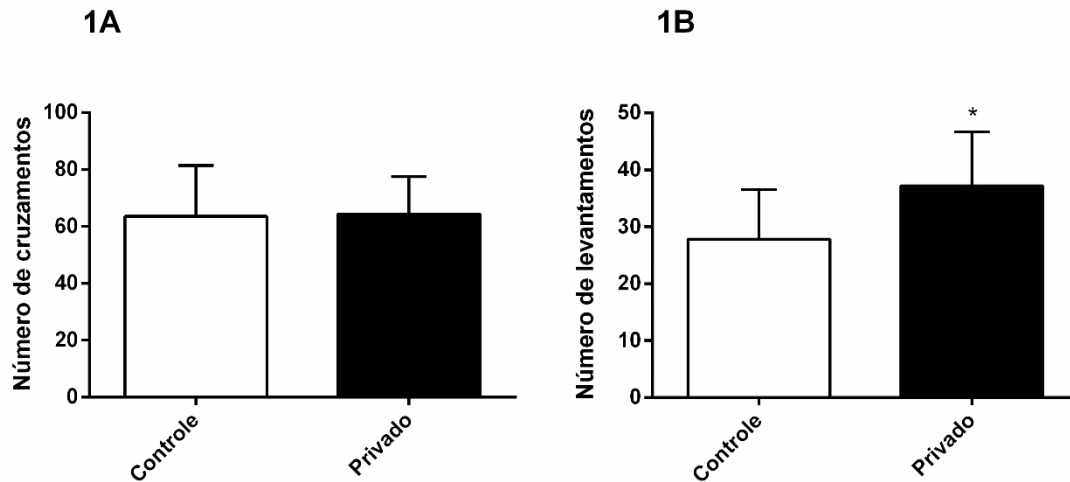


Figura 1: Avaliação da atividade locomotora (cruzamentos – **1A**) e exploratória (levantamentos –**1B**) após o protocolo de PSP em ratos *Wistar*. Os dados estão representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas através do teste t para amostras independentes. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

A **Figura 2** mostra os resultados referentes aos comportamentos estereotípicos, avaliados no teste do campo aberto. A PSP não alterou o tempo de autolimpeza dos animais (**Figura 2A**) e nem o tempo de limpeza das vibrissas (**Figura 2B**). Portanto, a PSP não induziu comportamentos estereotípicos nos animais.

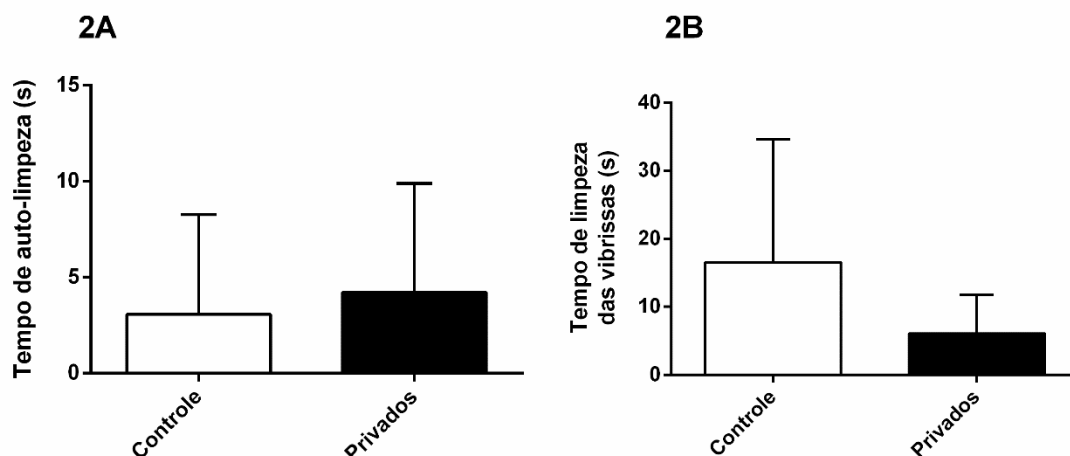


Figura 2: Avaliação do comportamento estereotípico, tempo de autolimpeza (**2A**) e tempo de limpeza das vibrissas (**2B**) após o protocolo de PSP em ratos *Wistar*. Os dados estão representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas através do teste t para amostras independentes.

A **Figura 3** mostra os resultados referentes à avaliação de parâmetros de ansiedade nos animais, avaliados também no teste do campo aberto. Foi observado que a PSP aumentou o número de visitas ao centro do campo aberto (**Figura 3A**), demonstrando diminuição de ansiedade. Além disso, a exposição ao centro do campo aberto aumentada é considerada um comportamento de risco nos animais. Também foi observado que os animais submetidos à PSP apresentaram uma redução na quantidade de bolo fecal durante o teste comportamental (**Figura 3B**), outro parâmetro que demonstra redução da ansiedade nos animais. Entretanto, não foi observado diferença significativa no tempo de latência no primeiro quadrante (**Figura 3C**) entre os animais controle e os animais submetidos à PSP.

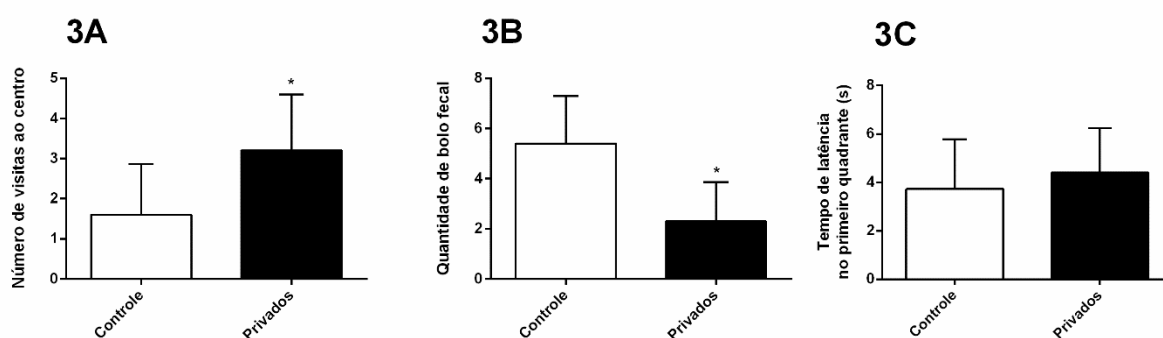


Figura 3: Avaliação de parâmetros de ansiedade, visitas ao centro do campo aberto (**3A**) e número de bolo fecal (**3B**) e tempo de latência para saída do primeiro quadrante (**3C**) após o protocolo de PSP em ratos *Wistar*. Os dados estão representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas através do teste t para amostras independentes. *p < 0,05 quando comparado com o grupo controle.

A **Figura 4** mostra os resultados para avaliação dos efeitos da PSP sobre o parâmetro de danos oxidativos lipídicos, avaliados através da quantificação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no músculo (**4A**), no rim (**4B**), no fígado (**4C**) e no coração (**4D**). Foi observado que a PSP não causou alterações significativas nos níveis de TBARS no músculo, no fígado e no coração dos animais. Entretanto, foi observado um aumento significativo nos níveis de TBARS no rim dos animais submetidos à PSP.

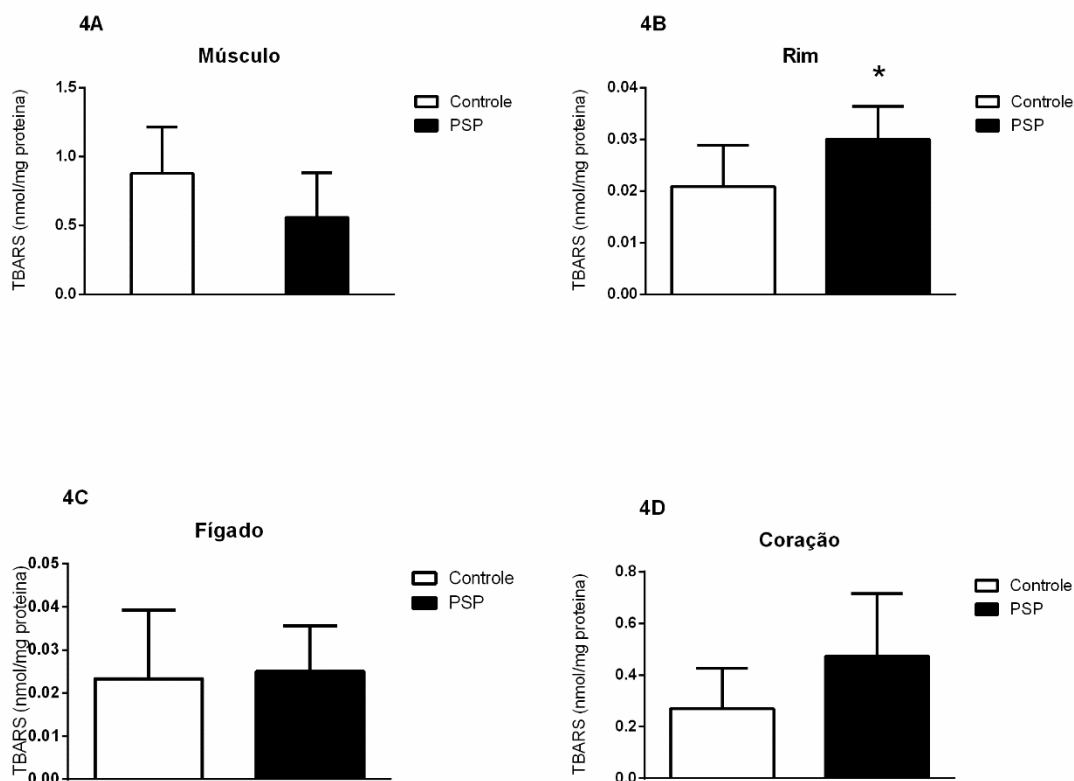


Figura 4: Avaliação de parâmetros de dano oxidativo lipídeos no músculo (4A), rim (4B), fígado (4C) e coração (4D), após o protocolo de privação do sono em ratos *Wistar*. Os dados estão representados como média e desvio padrão. As médias foram comparadas através do teste t para amostras independentes. *p < 0,05 quando comparado com o grupo controle.

Discussão

No presente estudo foi demonstrado que a PSP induziu aumento da atividade exploratória dos animais no teste do campo aberto, o qual demonstra hiperatividade nesses animais. A PSP aumentou também o número de visitas ao centro do campo aberto, o qual é considerado um comportamento de risco em roedores. Esses parâmetros comportamentais foram mensurados para avaliar os efeitos de uma PSP importante o suficiente para que fossem induzidas também alterações fisiológicas, as quais podem levar a alterações comportamentais. Os resultados do presente estudo corroboram com estudos anteriores, os quais demonstraram que a PSP induz hiperatividade e comportamento de risco elevado em roedores.^{4,31,32} Essa alteração comportamental induzida pela PSP pode ser explicada pelo fato de que a PSP e alterações no gene *CLOCK* – que mantém a periodicidade e permanência dos ritmos circadianos - podem levar a um aumento extracelular de dopamina. Por sua vez, a ativação excessiva do sistema dopaminérgico pode levar a alterações

comportamentais e fisiológicas observada nos animais privados do sono no presente estudo.³³

Além disso, PSP diminuiu a quantidade de bolo fecal, que pode ser considerado um parâmetro fisiológico de diminuição de ansiedade. Este resultado indica que a PSP altera o eixo cérebro-intestino através de sinais enviados através do fator liberador de corticotrofina, um importante mediador do sistema nervoso autonômico parassimpático, o qual aumenta a mobilidade do cólon.^{34,35,36} Portanto, a diminuição do número de fezes dos animais parece estar ligada com alterações do eixo hipotálamo-hipófise adrenal. Estes resultados corroboram com os resultados de aumento de visitas ao centro do campo aberto; portanto, pode ser sugerido que a PSP diminui parâmetros de ansiedade em ratos. É importante ressaltar que para ratos de laboratório, o comportamento de risco está associado com áreas abertas e elevadas, enquanto que as áreas mais fechadas representam um local seguro para os roedores. É só lembrar os ratos selvagens, quando estes entram em residências é difícil encontra-los expostos no meio dos cômodos, pois os cantos das casas, escondidos entre os móveis, representam segurança para essa espécie.³⁷ Esta relação risco/cuidado é a base para vários modelos comportamentais, destinados a medir condições mentais, como: ansiedade, medo, reatividade emocional, reações de pânico.^{38,39} Portanto, essa diminuição de ansiedade, observada através do aumento de visitas ao centro do campo aberto, induzida pela PSP, é considerada um comportamento de risco nos roedores.

Os efeitos da PSP podem ir além do cérebro e das alterações comportamentais. O sono é extremamente importante para as funções vitais dos órgãos do corpo. É descrito na literatura que a PSP pode desenvolver doenças e causar danos irreversíveis ao organismo.⁴⁰ Foi observado no presente estudo que 72h de PSP é capaz de, além de provocar alterações comportamentais, induzir dano oxidativo a lipídeos no rim dos animais, avaliado através de aumento dos níveis de TBARS. Um estudo pré-clínico, usando o modelo animal de PSP, demonstrou que 72h de PSP em roedores levou a disfunção renal.⁴¹ Esses resultados reforçam a hipótese de que funções renais podem ser moduladas por alterações no ciclo circadiano. De fato, alterações do sono podem estar relacionadas com doenças renais em humanos.⁴²

Valvassori e colegas⁴ demonstraram que a PSP pode levar a ativação do eixo HPA, a qual foi acompanhada de aumento de estresse oxidativo no cérebro e no

sangue de ratos. Alguns estudos demonstraram que glicocorticoides liberados a partir da glândula adrenal, em resposta a um estresse induzido através da ativação do eixo HPA, pode induzir estresse oxidativo. Também existem evidências que ligam o estado redox com alterações do ritmo circadiano.^{43,44} Estudos anteriores mostraram alterações no sistema redox de camundongos mutantes que sofreram alteração ou deleção dos genes CLOCK.⁴⁴ O ritmo circadiano possui uma oscilação natural no estado redox, o qual é modulado por um relógio biológico. Isso pode ser um gatilho para produção de enzimas antioxidantes espécies reativas de oxigênio dependendo do período do dia.⁴³ Sendo assim, pode-se sugerir que a PSP, que pode interromper a oscilação do ritmo circadiano, podendo desregular o estado redox, assim levando ao estresse oxidativo. Portanto, uma possível explicação para o dano oxidativo a lipídeos no rim dos induzidos pela PSP é a alterações do eixo HPA, que indiretamente pode levar ao estresse oxidativo.

Estudos anteriores demonstraram que a PSP em ratos pode alterar frequência cardíaca dos animais, assim como aumentar os níveis de Malondialdeído (MDA) no tecido cardíaco, indicando presença de dano oxidativo após diferentes protocolos de PSP.⁴⁵ Entretanto, no presente estudo não foi encontrada diferença significativa nos níveis de TBARS no coração dos animais submetidos à PSP. Deve-se considerar que TBARS é um produto final não específico da peroxidação lipídica e não foram realizadas outras técnicas para avaliar outros parâmetros de dano oxidativo a lipídeos. Além disso, o tempo do protocolo de PSP do presente estudo foi diferente do estudo de Chai e Xu⁴⁵, o que pode ser outra explicação para essa discrepância entre os estudos. Entretanto, Periasamy e sua equipe⁴¹ observaram uma diminuição nos níveis de MDA no coração de camundongos submetidos à 72h de PSP. Essa diferença, talvez, possa ser explicada pela diferença entre as espécies utilizadas nos estudos, tendo em vista que possuem metabolismos diferentes. Entretanto, esses resultados sugerem que dependendo do tempo de PSP, do organismo e do órgão avaliados, essa alteração do ciclo circadiano pode levar ao dano oxidativo.

No presente estudo não foi encontrada diferença significativa nos níveis de TBARS no músculo esquelético dos animais submetidos à PSP. Corroborando com os resultados do presente estudo, Gopalakrishnan e seus colaboradores⁴⁶ avaliaram os efeitos da PSP sobre o músculo esquelético de ratos, onde também não encontraram alterações em parâmetros de estresse oxidativo nesses tecidos.

Estes autores, além de avaliarem os níveis de TBARS, avaliaram também dano oxidativo a proteínas e a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase; porém, os autores também não encontraram alterações nesses parâmetros. É importante ressaltar que o artigo de Gopalakrishnan⁴⁶ é o único artigo que avalia parâmetros de estresse oxidativo muscular após a PSP. Portanto, mais estudos são necessários para melhor caracterizar o papel da PSP sobre o tecido muscular.

Estudos anteriores mostraram que a PSP pode levar a alterações no fígado de animais. Periasamy et al.⁴¹ mostraram que 72h de PSP levaram a um aumento de transaminase oxalacético-glutâmica (GOT), transaminase glutâmico-pirúvica (GPT), e bilirrubina total (TBIL), indicando dano hepático nos ratos. Estudos anteriores também mostraram que a PSP promove dano oxidativo em órgãos de animais.^{47,48} Chang e sua equipe⁴⁸ encontraram alterações nos níveis de TBARS no fígado de ratos submetidos à PSP, indicando presença de dano oxidativo a lipídeos. Entretanto, no presente estudo não foi encontrada diferença significativa nos níveis de TBARS no fígado dos animais submetidos à PSP em relação ao grupo controle. Uma possível explicação para essa diferença entre os estudos pode estar no tempo de PSP, tendo em vista que Chang et al.⁴⁸ utilizou um protocolo com 5 dias de privação e o presente estudo utilizou um protocolo com 72h. Os únicos dois estudos, além do presente estudo, que avaliaram dano oxidativo no fígado de animais foram os do grupo de Chang.^{47,48} Portanto, mais estudos são necessários para melhor caracterizar os efeitos da PSP sobre esse órgão.

Conclusão

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram que a PSP em roedores induziu hiperatividade, comportamento de risco e dano oxidativo a lipídeos no rim dos animais. Entretanto, não induziu dano oxidativo no músculo esquelético, no coração e no fígado dos ratos. Acredita-se que mais estudos, avaliando outros parâmetros de estresse oxidativo, são necessários para melhor caracterizar os efeitos da PSP sobre tecidos muscular, cardíaco, renal e hepático.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Psiquiatria Translacional da UNESC. Por nos conceder acesso ao laboratório, bem como espaço físico para que

a pesquisa fosse realizada. Gostaríamos de expressar nossa gratidão aos colegas que de alguma forma contribuíram para o levantamento de dados dessa pesquisa.

Referências

1. Pedroso NL, Barbosa Lima SJ, Pereira E, Dal-Bó M, Boing L, Fortunato JJ. Alterações comportamentais de ratos privados de sono paradoxal (PSP). X Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 2009.
2. Chen W, Kushida CA. Perspectives. In: Sleep deprivation: basic science, physiology and behavior. New York: Marcel Dekker. 2005: 1-30.
3. Lyall LM, Wyse CA, Graham N, Ferguson A, Lyall DM, Cullen B, Celis Morales CA, Biello SM, Mackay D, Ward J, Strawbridge RJ, Gill JMR, Bailey MES, Pell JP, Smith DJ. Association of disrupted circadian rhythmicity with mood disorders, subjective wellbeing, and cognitive function: a cross-sectional study of 91 105 participants from the UK Biobank. *Lancet Psychiatry*. 2018 Jun;5(6):507-514.
4. Valvassori SS, Resende WR, Dal-Pont G, Sangaletti-Pereira H, Gava FF, Peterle BR, Carvalho AF, Varela RB, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lithium ameliorates sleep deprivation-induced mania-like behavior, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis alterations, oxidative stress and elevations of cytokine concentrations in the brain and serum of mice. *Bipolar Disord*. 2017 Jun;19(4):246-258. doi: 10.1111/bdi.12503. Epub 2017 Jun 14.
5. Pires GN, Bezerra AG, Tufik S, Andersen ML. Effects of experimental sleep deprivation on anxiety-like behavior in animal research: Systematic review and meta-analysis. *NeurosciBiobehav Rev*. 2016 Sep; 68:575-589.
6. Villafuerte G, Miguel-Puga A, Rodríguez EM, Machado S, Manjarrez E, Arias-Carrión O. Sleep deprivation and oxidative stress in animal models: a systematic review. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015:234952.
7. Dattilo M, Antunes HK, Medeiros A, Mônico-Neto M, Souza Hde S, Lee KS, Tufik S, de Mello MT. 2012. Paradoxical sleep deprivation in duces muscle atrophy. *Muscle Nerve* 45:431–433.
8. Halperin D. Environmental noise and sleep disturbances: a threat to health? *Sleep Science*. 2014;7(4):209-12.
9. McMullan JC, Curhan CG, Forman PJ. Short sleep duration and decline in renal function. *Kidney International* (2016) 89, 1324–1330.
10. de Sa´ Souza H, Antunes HK, Dattilo M, Lee KS, Mônico-Neto M, de Campos Giampa SQ, Phillips SM, et al. 2016. Leucine supplementation is anti-atrophic during paradoxical sleep deprivation in rats. *Amino Acids* 48:949–957.

11. Mônico-Neto M, Giampa' SQ, Lee KS, de Melo CM, Souza Hde S, Da'ttilo M, Minali PA, et al. 2015. Negative energy balance induced by paradoxical sleep deprivation causes multicompartamental changes in adipose tissue and skeletal muscle. *Int J Endocrinol* 2015:908159.
12. Dattilo M, Antunes HK, Medeiros A, Neto MM, Souza HS, Tufik S, de Mello MT. 2011. Sleep and muscle recovery: Endocrinological and molecular basis for a new and promising hypothesis. *MedHypotheses* 77:220–222.
13. Kimoff RJ, Hamid Q, Divangahi M, Hussain S, Bao W, Naor N, Payne RJ, et al. 2011. Increased upper airway cytokines and oxidative stress in severe obstructive sleep apnoea. *EurRespir J* 38:89–97.
14. Piovezan RD, Abucham J, Dos Santos RV, Mello MT, Tufik S, Poyares D. 2015. The impact of sleep on age-related sarcopenia: Possible connections and clinical implications. *Ageing Res Rev* 23: 210–220.
15. Suchecki D, Tufik S. 2000. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *PhysiolBehav* 68:309–316.
16. Yehuda S, Sredni B, Carasso RL, Kenigsbuch-Sredni D. 2009. REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *J Interferon Cytokine Res* 29:393–398.
17. Everson CA, Crowley WR. 2004. Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *Am J PhysiolEndocrinolMetab* 286:E1060–E1070.
18. Adams GR. 2002. Invited review: Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. *J ApplPhysiol* 93:1159–1167.
19. Kovacheva EL, Hikim AP, Shen R, Sinha I, Sinha-Hikim I. 2010. Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. *Endocrinology* 151:628–638.
20. Mullington JM, Haack M, Toth M, Serrador JM, Meier-Ewert HK. Cardiovascular, inflammatory, and metabolic consequences of sleep deprivation. *ProgCardiovasc Dis.* 2009;51(4):294-302.
21. Cappuccio FP, Cooper D, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Sleep duration predicts cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur Heart J.* 2011;32(12):1484-92.
22. Ozer O., Ozbala B., Sari I., Davutoglu V., Maden E., Baltaci Y. Acute sleep deprivation is associated with increased QT dispersion in healthy young adults. *Pacing ClinElectrophysiol*, 31 (2008), pp. 979-984.

23. Sgoifoa A., Buwaldab B., Roosb M., Costolia T., Meratic G., Meerlo P. Effects of sleep deprivation on cardiac autonomic and pituitary-adrenocortical stress reactivity in rats. *Psychoneuroendocrinology (PNEC)*, 31 (2006), pp. 197-208.
24. Zuber AM, Centeno G, Pradervand S, et al. Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:16523–16528.
25. Tokonami N, Mordasini D, Pradervand S, et al. Local renal circadian clocks control fluid-electrolyte homeostasis and BP. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25:1430–1439.
26. Cochrane GC. Cellular Injury by Oxidants. *The American Journal of Medicine*. Volume 91; 1991.
27. Small HY, Migliarino S, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. Hypertension: Focus on autoimmunity and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2018 May 30. pii: S0891-5849(18)30938-9.
28. Flemming NB, Gallo LA, Forbes JM. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Diabetic Kidney Disease: Oxidative Stress and Beyond. *Semin Nephrol*. 2018 Mar;38(2):101-110.
29. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990;186(1):1-85.
30. Tufik S, Andersen ML, Bittencourt LR, Mello MT. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *An Acad Bras Cienc*. 2009;81:521-538.
31. Arent CO, Valvassori SS, Steckert AV, Resende WR, Dal-Pont GC, Lopes-Borges J, Amboni RT, Bianchini G, Quevedo J. The effects of n-acetylcysteine and/or deferoxamine on manic-like behavior and brain oxidative damage in mice submitted to the paradoxal sleep deprivation model of mania. *J Psychiatr Res*. 2015 Jun;65:71-9.
32. Streck EL, Scaini G, Jeremias GC, Rezin GT, Gonçalves CL, Ferreira GK, Réus GZ, Resende WR, Valvassori SS, Kapczinski F, Andersen ML, Quevedo J. Effects of Mood Stabilizers on Brain Energy Metabolism in Mice Submitted to an Animal Model of Mania Induced by Paradoxical Sleep Deprivation. *Neurochem Res*. 2015 Jun;40(6):1144-52.
33. Roybal K., Theobald D., Graham A., DiNieri J.A., Russo S.J., Krishnan V., et al. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *PNAS*, 104 (2007), pp. 6406-6411.
34. Saito K, Kasai T, Nagura Y, Ito H, Kanazaw M, Fukudo S (2005) Corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist blocks brain–gut activation induced by colonic distention in rats. *Gastroenterology* 129:1533–1543.

35. Taché Y, Martínez V, Million M, River J (1999) Corticotropin-releasing factor and the brain-gut motot response to stress. *Can J Gastroenterol* 13:18A-25^a.
36. Heinrichs SC, Lapsansky J, Lovenberg TW, De Aouza EB, Chalmers DT (1997) Corticotropin-releasing factor CRF₁ but not CRF₂ receptors mediate antiogenic like behavior. *RegulPept* 71:15-21.
37. Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *PhysiolBehav.* 1999 Dec 1-15;68(1-2):47-53.
38. Treit D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *NeurosciBiobehav Rev.* 1985 Summer;9(2):203-22.
39. Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *PharmacolTher.* 1990;46(3):321-40. Review.
40. Lima AM, de Bruin VM, Rios ER, de Bruin PF. Differential effects of paradoxical sleep deprivation on memory and oxidative stress. *NaunynSchmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014 May; 387(5):399-406.
41. Periasamy S, Hsu DZ, Fu YH, Liu MY. Sleep deprivation-induced multi-organ injury: role of oxidative stress and inflammation. *EXCLI J.* 2015 May 18;14:672-83.
42. Cheungpasitporn W, Thongprayoon C, Gonzalez-Suarez ML, Srivali N, Ungprasert P, Kittanamongkolchai W, Caples SM, Erickson SB. The effects of short sleep duration on proteinuria and chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2017 Jun 1;32(6):991-996.
43. Vollert C, Zagaar M, Hovatta I, et al. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *BehavBrain Res.* 2011;224:233-240.
44. Wang TA, Yu YV, Govindaiah G, et al. Circadian rhythm of redox stateregulates excitability in suprachiasmatic nucleus neurons. *Science.*2012;337:839-842.
45. Chai HJ, Xu SM. Damage effects of sleep deprivation on myocardium and its antioxygen index in rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li XueZaZhi.* 2008 Feb;24(1):71-6.
46. Gopalakrishnan A, Ji LL, Cirelli C. Sleep deprivation and cellular responses to oxidative stress. *Sleep.* 2004 Feb 1;27(1):27-35.
47. Chang HM, Wu UI, Lin TB, Lan CT, Chien WC, Huang WL, Shieh JY. Total sleep deprivation inhibits the neuronal nitric oxide synthase and cytochrome oxidase reactivities in the nodose ganglion of adult rats. *J Anat.* 2006 Aug;209(2):239-50.
48. Chang HM, Mai FD, Chen BJ, et al., Sleep deprivation predisposes liver to oxidative stress and phospholipid damage: a quantitative molecular imaging study. *Journal of Anatomy*, vol. 212, no. 3, pp. 295–305, 2008.