

# CONIC-SEMESP

## 13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

**TÍTULO:** EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL SOBRE A SINALIZAÇÃO CELULAR MEDIADA PELO RECEPTOR DE INSULINA NO MÚSCULO GASTROCNÊMICO DE RATOS

**CATEGORIA:** EM ANDAMENTO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** MEDICINA

**INSTITUIÇÃO:** UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

**AUTOR(ES):** STEFAN SOUZA SILVEIRA

**ORIENTADOR(ES):** DANIEL PAULINO VENANCIO

Realização:



Apoio:



**PROJETO DE PESQUISA**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

Daniel Paulino Venancio

Stefan Souza Silveira

**Efeito da Privação de sono Paradoxal sobre a Sinalização Celular mediada pelo  
Receptor de Insulina no músculo gastrocnêmio de ratos**

São Paulo

2012/2013

Daniel Paulino Venancio

Stefan Souza Silveira

**Efeito da Privação de sono Paradoxal sobre a Sinalização Celular mediada pelo Receptor de Insulina no músculo gastrocnêmico de ratos**

Projeto de pesquisa apresentado à Pró-reitoria Acadêmica  
para inscrição no processo de seleção no Programa de  
Iniciação Científica da Anhembi Morumbi 2012/2013.

São Paulo

2013/2014

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1 OBJETIVO GERAL .....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
3. JUSTIFICATIVA .....	4
4. METODOLOGIA .....	4
5. CRONOGRAMA .....	6
6. REFERÊNCIAS .....	6

## 1. INTRODUÇÃO

A redução na quantidade e qualidade do sono nas últimas décadas tem afetado milhares de pessoas, e isso, parece estar associado a inúmeros distúrbios metabólicos, entre eles o diabetes (Spiegel, 1999b). A redução no tempo total de sono (TTS) é um efeito comum a quase todos os distúrbios de sono, como a síndrome apnéia obstrutiva, a insônia os movimentos periódicos de pernas, entre outros.

Os mamíferos apresentam uma semelhança em relação ao sono, com dois padrões distintos de atividade no eletroencefalograma (EEG). O sono é dividido em sono não-REM e sono REM. O sono REM (do inglês, rapid eye movements) ou sono paradoxal está associado, entre outras coisas, aos sonhos. Além disso, as ondas cerebrais do sono REM apresentam uma intensa atividade elétrica com um padrão dessincronizado, semelhante ao da vigília. Podemos observar também, elevação da frequência cardíaca, pressão arterial, ereção peniana e atonia muscular, principalmente na região do pescoço. Já o sono NREM é subdividido em 4 estágios, sono 1, 2, 3 e 4. O sono 1 é um estágio de transição entre a vigília e o início de sono, já o estágio 2, apresenta um maior aprofundamento com ondas com características bem peculiares, como complexo K (essas ondas aparecem sempre que um estímulo sonoro ou físico ocorre e, isto, está associada à manutenção do sono). Os estágios 3 e 4 são denominados de sono de ondas lentas (SOL), as ondas cerebrais são em forma de delta, com alta amplitude e baixa frequência, é o sono mais profundo (Dement, 2004; Dement, 2005). Sob o ponto de vista metabólico durante o SOL, o cérebro utiliza menos glicose em seu metabolismo, o tônus simpático é reduzido e, por consequência ocorre elevação do tônus vagal (parasimpático), isto em relação à vigília e ao sono REM. Além disso, o SOL está associado à robusta elevação da concentração do hormônio do crescimento humano (GH), enquanto a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) está inibida.

O sono parece ter um importante papel sobre o controle da concentração de glicose sanguínea, pois, a privação de sono parcial e recorrente leva ao descontrole do metabolismo de glicose e ao mau funcionamento do eixo endócrino responsável pelo metabolismo dos carboidratos (Gambineri et al., 2003; Luboshitzky, 2000; Luboshitzky, 2005; Van, 1982; Van, 1994). Em um estudo interessante Tasali E. e cols.(2008) mostraram que a supressão do sono de ondas lentas (SOL), sem redução do tempo

total de sono, em adultos jovens, que não apresentavam distúrbio do sono, levou a uma diminuição acentuada da sensibilidade à insulina, intolerância à glicose e aumento do risco de desenvolvimento de diabetes do tipo 2. O estudo sugere que a redução do SOL, (como ocorre em idosos e obesos) independente do tempo total de sono, pode ser determinante para alterar o metabolismo da glicose.

Dentre outros fatores, parece que a privação de sono desregula, no sistema nervoso central (SNC), os mediadores químicos que desempenham o papel de regular o centro da saciedade e do apetite. Dentre esses mediadores, destacam-se a insulina e a leptina como reguladores de longo prazo, eles desempenham um papel de inibição do apetite (Spiegel, 1999a; Spiegel et al., 2009; Spiegel et al., 2004). Já a grelina, por outro lado, é um hormônio liberado no estômago e que estimula o apetite. Em estado não patológico a grelina aumenta rapidamente antes das refeições e cai igualmente após as refeições. Sabe-se que a duração do sono tem importante papel na regulação desses dois hormônios em humanos. Nesse sentido, ambos, a privação de sono parcial e o encurtamento do sono em humanos levam a uma redução e elevação da concentração de leptina e grelina, respectivamente, favorecendo uma maior ingestão calórica (Crispim, 2007).

Em animais, utiliza-se o modelo da privação de sono paradoxal (PSP), no qual, os mesmos são mantidos em um container contendo uma plataforma de 6,5 cm de diâmetro, submersos em água a uma altura de 1cm da sua superfície. Quando os animais entram em sono paradoxal ocorre atonia da musculatura da região do pescoço e, os mesmos, entram em contato com a água e despertam (Machado, 2004). Vários estudos mostraram que as conseqüências da PSP estão relacionadas a alterações comportamentais dos animais, como ansiedade, diminuição da capacidade de retenção de novas memórias, alteração hormonal e metabólica (Andersen, 2005; Martins, 2006; Martins, 2008; Suchecki, 1998).

Recentemente, foi observado que a PSP em ratos eleva o metabolismo energético, reduz a massa corporal e, paradoxalmente, aumenta a ingestão calórica (hiperfagia) em ratos submetidos a 20 dias de PSP. Este efeito está relacionado ao aumento da expressão da proteína desacopladora do tipo I, no tecido adiposo marron (Koban, 2005). Além do aumento da imunorreatividade do neuropeptídeo Y, sabidamente orexinérgico (Koban, 2006). Ainda, Hipolide e cols. (2006) demonstraram

que os animais submetidos à PSP 96 horas (PSP96h), apresentaram redução da concentração de insulina e de gordura na carcaças (Hipolide, 2006). Ainda, estudos de microarray demonstram que genes relacionados ao metabolismo têm a sua expressão alterada após a PSP por 96h (Guindalini, 2009;Cirelli, 2002).

Muitos trabalhos têm demonstrado a correlação entre a redução de ambas, a qualidade e a quantidade de sono e o aumento da incidência de diabetes em humanos, principalmente não insulino dependente ou tipo II (Spiegel et al., 2004;Spiegel et al., 2009). Inúmeros tecidos do organismo parecem ter uma participação determinante na gênese dos distúrbios metabólicos, como no caso do diabetes. O músculo esquelético tem função bastante importante na captação de glicose e regulação da glicemia, por meio do fino controle da sensibilidade à insulina (Grizard, 1999b). Este mecanismo está relacionada tanto à expressão dos receptores de insulina, na membrana do músculo esquelético, quanto da proteína de transporte de glicose, o GLUT 4 (Grizard, 1999a). A ação celular e molecular da insulina que culmina com mecanismo antiapoptótico e de sobrevivência celular, mediado pelas cascatas intracelulares disparada pelo receptor de insulina parece ter importante participação na gênese da resistência à insulina e, as proteínas sinalizadores que desempenham um importante papel regulador na translocação do GLUT 4, como o substrato do receptor de insulina do tipo I (IRS1), proteína quinase B (AKT), AS160 total e fosforilado, respectivamente.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar o efeito da privação de sono paradoxal por 96h sobre imunorreatividade e localização do receptor de insulina e do GLUT4.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Avaliar a glicemia e a concentração de insulina dos animais submetidos à privação de sono paradoxal por 96h.
- Avaliar a resposta da glicemia e a insulinemia frente ao Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

- Avaliar a expressão das proteínas IRS1, AKT e AS160 total e fosforilada.

## **Hipótese**

A alteração metabólica ocorrida com a privação do sono paradoxal leva uma mudança da concentração da insulina e, como conseqüência, pode alterar a captação de glicose. Deste modo, pode ocorrer, mudança tanto na expressão do receptor de insulina bem como da via de transdução de sinal intracelular que leva a translocação do transportador de glicose.

## **3. JUSTIFICATIVA**

O elevado número de indivíduos que, em virtude da falta de sono, apresentam inúmeras conseqüências metabólicas. Além disso, corroborando inúmeros resultados na literatura, estudos com animais de laboratório vêm mostrando que o eixo hormonal responsável pelo metabolismo dos carboidratos está desregulado durante a PSP por 96h, entretanto, não é de nosso conhecimento estudos que tenham investigado a expressão, tanto do receptor de insulina quanto da proteína de transporte da glicose, o GLUT 4 no músculo esquelético, bem como a via de sinalização intracelular mediada pelo hormônio insulina.

## **4. METODOLOGIA**

### **Protocolo Experimental - Privação de Sono Paradoxal 96h**

Será utilizado o método modificado das plataformas múltiplas, no qual, utilizamos 8 animais por grupo, todos eles da mesma gaiola moradia, sendo um grupo socialmente estável (Suchecki & Tufik 2000). Estes animais serão colocados em tanques contendo 14 plataformas de 6,5 cm de diâmetro. Estes tanques serão preenchidos com água até a altura de 1cm da superfície das plataformas, pois os animais, quando entram em sono paradoxal apresentam atonia da musculatura do pescoço e caem na água, entrando novamente em vigília. Este ciclo se repete ao longo das 96h. Neste modelo, os animais apresentam completa supressão do sono paradoxal nos 4 dias do protocolo. Ainda, com relação ao sono de ondas lentas, ocorre uma redução de aproximadamente 50% deste estágio, ao longo do registro de 24h (Machado et al. 2004)



## **Grupos Experimentais**

- Controle (CTL): Ratos que ficarão em suas gaiolas moradias durante o período do experimento (N=8)
- Privação de sono 96 horas (PSP96h): Ratos que serão submetidos a Privação de sono paradoxal por 96 horas (N=8)
- Controle Salina (CTLS): Ratos que ficarão em suas gaiolas moradias e receberão salina (N=8)
- Controle Glicose (CTL G): Ratos que ficarão em suas gaiolas moradias e receberão glicose (N=8)
- Privação de sono 96 horas Salina (PSP96h/S): Ratos que serão submetidos a Privação de sono paradoxal por 96 horas e receberão solução salina(N=8)
- Privação de sono 96 horas Glicose (PSP96h/G): Ratos que serão submetidos a Privação de sono paradoxal por 96 horas e receberão glicose (N=8)

## **Eutanásia**

Após o período de privação de sono paradoxal, os animais serão sacrificados em uma sala contígua ao local de privação de sono pelo método da decapitação.

## **Isolamento dos tecidos**

Após o sacrifício dos animais, amostras de sangue serão coletadas em tubos de coleta seco e contendo EDTA (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e processadas para dosagem de insulina e glicose. Em seguida, os animais serão colocados em decúbito dorsal para a realização da biópsia muscular nas patas traseiras. Os músculos gastrocnêmios serão identificados, separados dos tecidos adjacentes, retirados e cuidadosamente dissecados. A parte medial do gastrocnêmio da pata direita traseira será separada para realização de imunohistoquímica. O músculo gastrocnêmio da pata esquerda será congelado inteiro em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) para extração de proteína, e estocados em freezer a -80°C.

O congelamento do fragmento para o procedimento de imunohistoquímica será realizado em N<sub>2</sub>. Estes fragmentos serão passados em amido de milho até que

fiquem completamente cobertos, colocados em cortiça e colados com solução crioprotetora, posteriormente, serão congelados em N<sub>2</sub> e estocados a -80°C.

### **Ensaio de Imuno-histoquímica e Western Blotting**

Cortes histológicos do gastrocnêmio medial (8 µm) serão obtidos em criostato a -20°C, transferidos para lâminas silanizadas Star Frost (Waldermar Knittel, Alemanha) e mantidos a temperatura ambiente por 30 min. Os cortes serão mergulhados em tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,03 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, pH 7,4) por 10 min. Os cortes serão incubados por 15 min com solução de 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para bloqueio da peroxidase endógena, seguido de 3 lavagens de 5 minutos cada em PBS. A biotina tecidual endógena será bloqueada utilizando-se o Avidin/Biotin Blocking kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Em seguida, as lâminas serão incubadas em câmara úmida, a temperatura ambiente por 1 h, com tampão de bloqueio (tampão PBS contendo saponina 0,01% e albumina 3%). Após lavagem com tampão PBS por 5 min, as lâminas serão incubadas a 4°C por 14-16 h com anticorpo primário contra IR e GLUT-4 diluídos em tampão de bloqueio. Após 6 lavagens de 5 min cada, com tampão de bloqueio, as lâminas serão incubadas a temperatura ambiente por 1 h com o anticorpo secundário conjugado com biotina (1:200) diluído em tampão de bloqueio. O sistema Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) será utilizado para evidenciar o imunocomplexo formado pelo anticorpo secundário ligado ao anticorpo primário, de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. Para tal, as lâminas serão incubadas a temperatura ambiente por 1,5 h com avidina-biotina. Após 6 lavagens de 5 min cada com tampão PBS, as lâminas serão reveladas por 3 min com solução de 3,3-diaminobenzidina (DAB) (0,5 mg/ml) contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01%. Em seguida, as lâminas serão novamente lavadas com tampão PBS, secadas a temperatura ambiente, contracoradas com azul de metileno (0,03% em tampão PBS) e montadas em Permount (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EUA). Os resultados serão visualizados em microscópio Olympus BX50. As imagens serão capturadas por câmera digital e analisadas com programa de documentação Image-Pro Express (Media Cybernetics). Cada experimento será analisado de forma independente e as análises serão compiladas em uma avaliação final da distribuição celular do IR e do GLUT-4 no gastrocnêmio, bem como suas respectivas alterações após o protocolo de privação de sono. A avaliação final será utilizada para a escolha das figuras que

melhor representarão os padrões de imunorreatividade para os anticorpos contra IR e GLUT-4, observados nos cortes de gastrocnêmio medial de ratos do grupo experimental, nos diferentes experimentos realizados. Como controle negativo para confirmar a especificidade das marcações será feita um ensaio sem a utilização do anticorpo primário (IR e GLUT-4).

A expressão das proteínas IR, GLUT-4, IRS-1, AKT e S100 total e fosforilada, respectivamente pela técnica de western blotting.

## 5. Cronograma

ATIVIDADES	MES/ANO 2013											
	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Pesquisa Bibliográfica	X	X										
Elaboração do Projeto		X	X									
Avaliação do Projeto				X								
Coleta de dados					X	X	X					
Redação								X				
Conclusão									X			
Apresentação/ defesa (se houver)										X		
Relatório(s) CEP											X	
Publicação												X

## 6. Referência Bibliográfica

1. Andersen, M.L. 2005. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats.
2. Cirelli, C. 2002. How sleep deprivation affects gene expression in the brain: a review of recent findings. *J. Appl. Physiol* 92:394-400.
3. Crispim, C.A. 2007. The influence of sleep and sleep loss upon food intake and metabolism.
4. Dement, W.C. 2004. The paradox of sleep: the early years. *Arch. Ital. Biol.* 142:333-345.
5. Dement, W.C. 2005. History of sleep medicine. *Neurol. Clin.* 23:945-65.
6. Gambineri, A., C.Pelusi, and R.Pasquali. 2003. Testosterone levels in obese male patients with obstructive sleep apnea syndrome: relation to oxygen desaturation, body weight, fat distribution and the metabolic parameters. *J. Endocrinol. Invest* 26:493-498.
7. Grizard, J. 1999b. Insulin action on skeletal muscle protein metabolism during catabolic states.
8. Grizard, J. 1999a. Insulin action on skeletal muscle protein metabolism during catabolic states.
9. Guindalini, C. 2009. To what extent is sleep rebound effective in reversing the effects of paradoxical sleep deprivation on gene expression in the brain?
10. Hipolide, D.C. 2006. Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats.
11. Koban, M. 2005. Chronic REM-sleep deprivation of rats elevates metabolic rate and increases UCP1 gene expression in brown adipose tissue.
12. Koban, M. 2006. Changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone, neuropeptide Y, and proopiomelanocortin gene expression during chronic rapid eye movement sleep deprivation of rats.

13. Luboshitzky, R. 2000. Endocrine activity during sleep. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab* 13:13-20.
14. Luboshitzky, R. 2005. Altered luteinizing hormone and testosterone secretion in middle-aged obese men with obstructive sleep apnea.
15. Machado, R.B. 2004. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery.
16. Martins, P.J. 2006. A reassessment of the hyperphagia/weight-loss paradox during sleep deprivation.
17. Martins, P.J. 2008. Sleep deprivation-induced gnawing-relationship to changes in feeding behavior in rats.
18. Spiegel, K. 1999b. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function.
19. Spiegel, K. 1999a. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function.
20. Spiegel, K., R.Leproult, M.L'hermite-Baleriaux, G.Copinschi, P.D.Penev, and E.Van Cauter. 2004. Leptin levels are dependent on sleep duration: relationships with sympathovagal balance, carbohydrate regulation, cortisol, and thyrotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89:5762-5771.
21. Spiegel, K., E.Tasali, R.Leproult, and E.Van Cauter. 2009. Effects of poor and short sleep on glucose metabolism and obesity risk. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5:253-261.
22. Suchecki, D. 1998. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation.
23. Van, C.E. 1982. The relationship between episodic variations of plasma prolactin and REM-non-REM cyclicity is an artifact.
24. Van, C.E. 1994. Demonstration of rapid light-induced advances and delays of the human circadian clock using hormonal phase markers.

