

**NEULI MARIA TENÓRIO**

**EFEITOS DA PRIVAÇÃO DE SONO SOBRE OS  
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS  
MACHOS E FÊMEAS**

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

São Paulo  
2011

Tenório, Neuli Maria

**Efeitos da privação de sono sobre parâmetros cardiovasculares em ratos machos e fêmeas** / Neuli Maria Tenório - São Paulo, 2011.

xiii, 120p.

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

**Effects of sleep deprivation in cardiovascular parameters in male and female rats.**

1. Obesidade; 2. Privação de sono; 3. Diferença entre sexos; 4. Pressão arterial;  
5. Baroreflexo cardíaco.

**NEULI MARIA TENÓRIO**

**EFEITOS DA PRIVAÇÃO DE SONO SOBRE OS  
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS  
MACHOS E FÊMEAS**

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

*Orientadora:*

Profa. Dra. Monica Levy Andersen

*Co-orientadora:*

Profa. Dra. Cássia de T. Bergamaschi

São Paulo

2011

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

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA**

Profa. Dra. Maria Lúcia Oliveira de Souza Formigoni

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

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

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dra. Ana Raimunda Dâmaso

Prof. Dr. Geraldo Lorenzi Filho

Prof. Dra. Nádia Carla Cheik

**SUPLENTE**

Prof. Dr. Helena Hachul de Campos

Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina no período de setembro de 2009 à julho de 2011, com o apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP).

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”*

*José de Alencar*

# *Agradecimientos*



## **Agradecimentos**

À minha orientadora **MONICA ANDERSEN** pela oportunidade de usufruir do seu amplo conhecimento e de ter realizado o meu sonho de estudar nesta universidade.

À minha co-orientadora **CÁSSIA BERGAMASCHI** e ao Dr. **RUÝ RIBEIRO CAMPOS** por oferecerem o laboratório de Fisiologia Cardiovascular para as análises deste trabalho e por seus ensinamentos.

Ao Dr. **SERGIO TUFIK** por oferecer as melhores condições para desenvolver este estudo.

À todos aqueles que me auxiliaram no início da minha jornada acadêmica desde os inesquecíveis anos de aluna de iniciação científica.

Às colegas de grupo do Departamento de Psicobiologia que foram fundamentais para que este trabalho fosse concretizado: **TATHIANA ALVARENGA**, **CAMILA HIROTSU** e **VANESSA KAHAN**, sempre dispostas a ajudar durante os experimentos.

À amiga **JULIANA PERRY**, por me ensinar, ouvir, entender e oferecer conhecimento.

Às amigas do Departamento de Fisiologia, Disciplina de Fisiologia Cardiovascular: **ERIKA NISHI**, **NÚBIA FARDIN** e **THAÍS GALVÃO** que além de ensinar procedimentos e técnicas, nunca deixaram que eu desistisse mesmo nos momentos em que eu acreditava não ser mais possível continuar.

Aos colegas de curta ou longa convivência dos Departamentos de Psicobiologia e Fisiologia Cardiovascular: **ADRIANO ZAGER**, **ELIZABETH SALES**, **FERNANDA ARMANI**, **FLÁVIA EGYDIO**, **FRANCIELLI RUIZ**, **GABRIEL PIRES**, **GLAUCIA DA VEIGA**, **GISELE LINCEVICIUS**, **KAREN NOZOE**, **PAULA ARAÚJO**, **RAFAEL SANFURGO**, **RAPHAEL RIBEIRO** e **TEREZA SCHUTZ**.

A todos os funcionários do departamento de Psicobiologia, em especial **MARILDE AIRES**, **MAGDA BIGNOTTO**, **WALDERMAKS LEITE (DUNGA)**, **RICARDO MARQUES**, **MANOEL SOUZA NOVAES** e **SEBASTIÃO DA SILVA**. Os dois últimos, pelos “cafés” dos finais de semana que me estimulavam a escrever mesmo nos momentos de pouca concentração.

# *Sumário*

## SUMÁRIO

Resumo .....	x
Abstract .....	xii
<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Sono. Aspectos Gerais .....	1
1.2 Privação de Sono e Ganho de Peso .....	3
1.3 Obesidade .....	5
1.4 Interação entre Privação de Sono e Sistema Cardiovascular .....	8
1.5 Diferenças Sexuais no Controle Cardiovascular e no Sono .....	12
<b>2.0 JUSTIFICATIVA</b> .....	16
<b>3.0 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>4.0 MÉTODO</b> .....	18
4.1 Animais.....	18
4.2 Esfregaço Vaginal .....	19
4.3 Instrumentação Cirúrgica para Aquisição dos Parâmetros Cardiovasculares .....	19
4.4. <b>ARTIGO 1</b> .....	21
4.4.1 Grupos Experimentais .....	21
4.4.2 Privação de Sono Aguda (PS) .....	21
4.4.4 Análise Estatística .....	22
4.5. <b>ARTIGO 2</b> .....	23
4.5.1 Grupos Experimentais .....	23
4.5.2 Privação de Sono Paradoxal (PSP).....	23
4.5.3 Restrição de Sono (RS) .....	24
4.5.4 Coleta de Sangue .....	24
4.5.5 Análise Hormonal .....	24
4.5.6 Análise Estatística .....	25

<b>5.0 RESULTADOS</b> .....	26
5.1 ARTIGO I.....	26
5.2 ARTIGO II.....	51
<b>6.0 DISCUSSÃO</b> .....	79
<b>7.0 CONCLUSÕES</b> .....	91
<b>8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	92
<b>ANEXO I</b> .....	110
<b>ANEXO II</b> .....	112

*Resumo*

## RESUMO

A redução no tempo de sono caracteriza a sociedade moderna. A associação recíproca entre a duração do sono e o ganho de peso tem sido atualmente explorada. Contudo, as conseqüências desses fatores no sistema cardiovascular permanecem não completamente elucidadas, principalmente quando verificadas ao longo da vida. Além disso, as conseqüências da privação de sono ainda podem sofrer a influência do fator sexo. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o impacto da privação de sono aguda associada à obesidade em ratas Zucker de diferentes idades (Artigo 1) e comparar os efeitos da privação de sono paradoxal (PSP) e restrição de sono (RS) crônica em ratos eutróficos machos e fêmeas (Artigo 2) nos parâmetros cardiovasculares (Artigos 1 e 2) e hormonal (Artigo 2).

Para a realização do Artigo 1, ratas Zucker fêmeas magras e obesas de 3, 6 e 15 meses de idade foram distribuídas em grupos controle (CTRL, gaiolas-moradia) ou privação de sono (PS). Para o Artigo 2, ratos adultos machos e fêmeas da linhagem Wistar foram distribuídos nos grupos: controle (CTRL, gaiolas-moradia), PSP (ratos submetidos a PSP por 96 horas) ou RS (ratos submetidos à RS por 21 dias). Para ambos os artigos, os animais foram anestesiados após respectivo protocolo de PS ou tempo equivalente nos grupos CTRL, para cateterização da artéria e veia femorais. Em seguida, o índice de sensibilidade baroreflexa foi mensurado por infusões de fenilefrina (resposta bradicárdica) e nitroprussiato de sódio (resposta taquicárdica). No caso do Artigo 2, outro grupo de animais foi utilizado para a coleta sanguínea a fim de avaliar as concentrações de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). No Artigo 1, observamos que a obesidade resultou em disfunção da resposta taquicárdica nos animais desde os 3 meses de idade. Aos 6 e

15 meses de idade, a resposta bradicárdica e taquicárdica foram significativamente menores em animais obesos comparados aos respectivos grupos magros. Aos 15 meses de idade, a interação entre obesidade, PS e idade provocou as maiores conseqüências no sistema cardiovascular, uma vez que aumentou a pressão arterial, a freqüência cardíaca e reduziu a sensibilidade baroreflexa. No Artigo 2, os resultados mostraram que a pressão arterial média foi significativamente maior no grupo RS comparada ao grupo CTRL em ambos os sexos. Em fêmeas, a freqüência cardíaca foi significativamente maior após a PSP comparada ao respectivo grupo CTRL. O protocolo de RS atenuou a resposta baroreflexa vagal similarmente em ratos machos e fêmeas. A resposta baroreflexa simpática foi atenuada nos grupos PSP e RS, contudo, em fêmeas este parâmetro foi afetado apenas após o procedimento de PSP. Nenhuma diferença significativa em relação ao sexo foi observada para qualquer parâmetro cardiovascular em ratos da linhagem Wistar, apenas a PSP aumentou significativamente as concentrações de ACTH comparado ao grupo CTRL em ambos os sexos. Em conjunto, esses resultados sugerem que diferentes durações de perda de sono levam a conseqüências específicas nos parâmetros cardiovasculares e hormonais e estes efeitos foram similares entre ratos machos e fêmeas no caso de ratos eutróficos. Em animais obesos, a associação entre os fatores de risco (obesidade, PS e idade) exerceram as piores conseqüências nos parâmetros cardiovasculares analisados.

*Abstract*



## **ABSTRACT**

Curtailment of sleep time is a characteristic of modern society, and the reciprocal association between duration of sleep and weight gain has been under scrutiny as of late. The consequences of such factors upon the cardiovascular system remain to be fully elucidated, particularly along a full life span. Moreover, the consequences of sleep deprivation may also be influenced by the gender. The current study thus purported to examine the impact of acute sleep deprivation associated to obesity in female Zucker rats of different ages (Paper 1) and to compare the effects of paradoxical sleep deprivation (PSD) and chronic sleep restriction (SR) in male and female eutrophic rats (Paper 2) upon the cardiovascular (Papers 1 and 2) and hormonal (Paper 2 ) parameters.

For the experiments described in Paper 1 lean and obese female Zucker rats 3, 6, and 15 months old were distributed into either control groups (CTRL, home-cage) or sleep deprived (SD). For the experiments of Paper 2 adult female and male Wistar rats were distributed in either control groups (CTRL, home-cage) or in Paradoxical Sleep Deprivation for 96h groups (PSD-96h) or Sleep Restriction for 21 days groups (SR 21 days). In both experiments the subjects were anesthetized according to respective SD protocol or equivalent time in the CTRL groups, after which a catheter was placed in their femoral artery and vein. The baroreflex sensibility index was measured by means of phenylephrine (bradycardiac response) and sodium nitroprussiate (taquicardiac response). For the experiments conducted for Paper 2 a different group of subjects was used for blood harvesting to assess the concentrations of adrenocorticotrophic hormone (ACTH). In Paper 1 we observed that obesity resulted in dysfunctional taquicardia in subjects from 3 months of age

and on. At 6 and 15 months of age the bradycardiac and taquicardiac response were significantly smaller in obese subjects when compared to respective lean groups. At 15 months of age the interaction between obesity, SD and age caused the greatest consequences in the cardiovascular system as arterial. Results of Paper 2 show that the average arterial pressure was significantly higher in the SR group when compared to the CTRL group in both genders. In females, cardiac frequency was significantly higher after PSD when compared to respective controls. The SR protocol attenuated the vagal baroreflex response similarly in males and females. The sympathetic baroreflex response was attenuated in the PSD and SR groups, but in females this parameter was affected only after PSD. No significant difference in relation to gender was observed in any of the cardiovascular parameters. PSD did increase ACTH concentrations significantly when compared to controls of both genders. The body of results yielded by both studies suggests that different periods of lost sleep lead to specific consequences in cardiovascular and hormonal parameters, and such effects were similar in male and female rat subjects.

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Sono - Aspectos gerais

O sono é um fenômeno biológico fundamental para a manutenção da saúde mental e emocional. Fisiologicamente é considerado como um estado funcional, cíclico e reversível que está presente em todas as faixas etárias e na maioria das espécies animais.

Nos últimos anos têm sido possível demonstrar que além de repouso, o sono também tem funções importantes na manutenção do humor em animais (Benedetti et al., 2005; Knutson et al., 2006), memória e desempenho cognitivo (Durmer e Dingus, 2005). O sono tem ainda um papel nas funções endócrinas (Knutson et al., 2006; Andersen e Tufik, 2008) e sistema imunológico (Bryant et al., 2004; Ruiz et al., 2007, 2011; Zager et al., 2007, 2009). Além disso, existe evidência de uma associação entre a duração do sono, seja por razões comportamentais ou patológicas, e uma série de problemas de saúde, incluindo depressão, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, doença cardíaca coronária, aterosclerose, obesidade (Logan et al., 2001; Lorenzi-Filho et al., 2002; Ayas et al., 2003; Drager et al., 2007) entre outros.

A arquitetura do sono nas diferentes espécies é fortemente influenciada por fatores genéticos e ambientais, incluindo sexo, raça, status socioeconômico e cultural entre outros. A duração do sono nos mamíferos em geral, depende do tamanho do animal. Elefantes dormem apenas 3 horas de sono, enquanto os ratos e os gatos podem passar até 13 horas de sono. Postula-se que isto pode ser devido a diferenças no metabolismo.

O ciclo vigília-sono em humanos segue um ritmo circadiano de aproximadamente 8 horas de sono alternando com 16 horas de tempo de vigília durante o dia. Na primeira parte da noite ocorre o sono de ondas lentas ou não-REM (NREM), caracterizado pela lentificação progressiva da atividade cortical com 4 estágios: estágio 1 (sonolência); estágio 2 (sono “leve”); estágio 3 e 4 (sono de ondas lentas propriamente dito). Esses estágios usualmente ocorrem em seqüência, freqüentemente com flutuações ao longo da noite. A seguir, ocorre o sono REM (do inglês *Rapid Eye Movements*) que tem como principais características o movimento rápido dos olhos e atonia muscular, além de ser o período em que ocorrem os sonhos (Dement e Kleitman, 1957). O sono REM também é denominado sono paradoxal, uma vez que o padrão eletroencefalográfico é semelhante ao da vigília, apesar da atonia muscular que sugere um sono profundo (Jouvet et al., 1962). Um ciclo de sono completo consiste de uma seqüência de sono NREM e REM, e cada ciclo tem duração em média de 90 a 110 minutos. Em geral, são observados de 4 a 6 ciclos durante uma noite de sono. Os episódios de sono REM aumentam do primeiro ao último ciclo de sono e podem durar até uma hora no fim da noite.

Em ratos, os episódios de sono freqüentemente concentram-se durante o período claro, enquanto que a vigília predomina no período escuro. Os roedores, em média, dormem cerca de 62% do período claro e 33% do período escuro, sendo que, durante a vigília, os animais realizam suas atividades vitais e sociais (alimentação, procriação, interação social e exploração do ambiente). Somando-se os períodos de sono, verifica-se que os ratos dormem cerca de 70% das 24 horas, dividindo-se em sono de ondas lentas e sono paradoxal (Timo-laria et al., 1970; Andersen et al., 2001).

Na década de 70, foi realizada uma detalhada e minuciosa análise das várias fases do sono do rato. Este estudo revelou a existência de semelhanças com o sono humano muito maior do que se acreditava até então (Timon-Laria et al., 1970). Por se tratar de animais naturalmente predados em seu habitat natural, ratos e camundongos possuem um padrão de sono polifásico, caracterizado por um ciclo vigília-sono freqüentemente irregular. Os primeiros ciclos são incompletos, mas depois se regularizam, terminando quase sempre com despertar breve, cuja duração em geral não passa de um segundo. Esse breve despertar parece ser característico de animais naturalmente predados (roedores), ao passo que os predadores (homem, gato, cão) raramente despertam entre um ciclo e outro, apresentando um padrão de sono monofásico. Entretanto, breves períodos de vigília ou pelo menos superficialização do sono (microdespertares) também ocorrem em seres humanos. É possível que no rato esses curtos períodos de vigília tenham por finalidade explorar olfativamente o ambiente, a fim de identificar alguma eventual ameaça presente nas redondezas (Andersen et al., 2001).

## 1.2 Privação de sono e ganho de peso

Embora o sono ocupe aproximadamente um terço do nosso tempo de vida, e enquanto há centenas de anos as pessoas dormiam 10 horas por noite, a sociedade atual está cada vez mais privada de sono, sendo este um dos mais comuns problemas de saúde pública (Leibowitz et al., 2006; Tufik et al., 2009). A prevalência dos distúrbios de sono tem se tornado uma condição endêmica na sociedade moderna. A necessidade biológica de sono é muitas vezes confrontada com imperativos sociais, culturais e econômicos, que implicam maior quantidade de horas em vigília. De fato, atualmente, apenas um terço da população (37%) relatou ter 8 horas de sono por noite e 31% relataram 6 horas ou menos (Bonnet e Arand, 1995). Esses dados evidenciam que a população está dormindo apenas 6,8 horas por noite, 1,5 horas a menos do que há um século (*National Sleep Foundation*, 2003).

A literatura atual tem evidenciado que há associações entre o déficit no padrão usual de sono e as alterações resultantes da ingestão alimentar, tanto quanto no metabolismo da glicose e da gordura. Estudos sugerem que indivíduos que dormem menos têm grande probabilidade de se tornarem obesos. As alterações no ritmo podem influenciar vários aspectos associados com o balanço metabólico do corpo, como o controle da massa corporal e da ingestão alimentar, e os níveis de colesterol e triglicérides. Por outro lado, indivíduos obesos apresentam dificuldade em ter um sono reparador e geralmente são privados de sono, logo, pode-se afirmar que há uma associação bidirecional entre ganho de peso e privação de sono (PS).

A PS parece aumentar não apenas o apetite, mas também a preferência por comidas que contenham mais calorias (Taheri et al., 2004). Spiegel e colaboradores (2004a) mostraram que o apetite para nutrientes ricos em calorias e com alto teor de

carboidratos, incluindo doces, salgadinhos e comidas enlatadas aumentaram de 33% para 45%. Por outro lado, o apetite para frutas, vegetais e nutrientes com alto teor de proteínas foi menos afetado. Alguns estudos já observaram que trabalhadores noturnos tendem a se alimentar com comidas de baixa qualidade nutricional e preferem *fast-food* e salgados ricos em gorduras (Sudo e Ohtsuka, 2001; Crispim et al., no prelo). Ainda, alterações na ingestão alimentar aumentam os riscos de obesidade (Gilbert e Ryan, 2011; Hariri e Thibault, 2011), dislipidemias (Tappy et al., 2010; Panchal et al., 2011) e doenças cardiovasculares (Sudo e Ohtsuka, 2001).

Estudos recentes sugerem que a redução no tempo total de sono está associada com 2 comportamentos endócrinos paralelos que podem alterar significativamente a ingestão alimentar: a redução do hormônio leptina (Spiegel et al., 2004b; Taheri et al., 2004) e o aumento do hormônio grelina (Taheri et al., 2004). Esta combinação de mudanças resulta em aumento da fome e ingestão alimentar (Spiegel et al., 2004b). Em particular, a pesquisa experimental conduzida por Spiegel e colaboradores (2004a) mostrou que a restrição de sono por 2 dias em homens foi associada com um aumento de 28% nos níveis de grelina, redução de 18% nos níveis de leptina e aumento de 24% na fome e 23% no apetite.



### **1.3 Obesidade**

A partir de meados do século passado, começou-se a acumular evidências de que a obesidade era uma condição que poderia prejudicar a saúde das pessoas. Hoje está bem estabelecido que, esta doença plurimetabólica, aumenta muito o risco das pessoas desenvolverem hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares.

Ao mesmo tempo em que se descobria o quanto o excesso de peso pode ser danoso à saúde, a humanidade testemunhou, nos últimos 50 anos, um aumento da prevalência da obesidade, ao ponto de a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerá-la uma epidemia global. Com início alguns anos mais tarde e de forma, por enquanto menos intensa, vem se observando que o aumento da prevalência da obesidade também está ocorrendo entre crianças e adolescentes, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Styne, 2001). No Brasil, enquanto a desnutrição diminuía, a obesidade começou a aumentar (Wang et al., 2002).

Segundo a OMS, o número de obesos entre 1995 e 2000 passou de 200 para 300 milhões, perfazendo quase 15% da população mundial. Estimativas mostram que, em 2025, o Brasil será o 5º país no mundo a ter problemas de obesidade em sua população, podendo ser considerada uma epidemia mundial. A etiologia da obesidade não é de fácil identificação. É caracterizada como uma doença multifatorial, ou seja, diversos fatores externos podem influenciar hábitos de vida que, juntamente com fatores biológicos, podem desequilibrar o balanço energético, favorecendo o ganho de peso. Outros fatores psicológicos, socioeconômicos, culturais e ambientais (incluindo acesso à alimentação de qualidade, infra-estrutura

para exercício físico, acesso à informação e a serviços de saúde) podem influenciar padrões alimentares e de atividade física, além de outros hábitos como o tabagismo e o sono. Assim, a obesidade pode ser classificada em 2 contextos: por determinação genética ou fatores endócrinos e metabólicos, ou então, influenciada por fatores externos, sejam eles de origem dietética, comportamental ou ambiental. A grande similaridade e homologia entre os genomas dos roedores e dos humanos tornam modelos animais uma importante ferramenta para o estudo de condições que afetam os humanos e que podem ser simuladas em ratos (Diemen et al., 2006).

Nesse sentido, o rato Zucker obeso (*Rattus norvegicus*) aparece como resultado de uma mutação espontânea do cruzamento entre os ratos Merck Stock M. e Sherman. A obesidade é transmitida como um traço recessivo autossômico mendeliano e os animais homozigotos (*fa/fa*) sofrem as conseqüências da obesidade genética, acumulando gordura progressivamente à partir da 5ª semana de vida enquanto os homozigotos alelos (*FA/FA*) ou heterozigotos (*FA/fa*) permanecem magros e sem qualquer alteração metabólica ao longo de toda a vida. O mecanismo molecular exato do gene *fa* é desconhecido. Todavia, o animal com gene homozigoto sob alimentação *ad libitum* em razão de sua hiperfagia e hipoaividade física, apresenta alterações características da síndrome metabólica, como por exemplo, hiperinsulinemia (Johnson et al., 2006), resistência à insulina e hiperlipidemia (Bray, 1977; Argilés, 1989), bem como hipotermia, eficiência em transformar calorias ingeridas em depósitos de gordura e capacidade reduzida de utilizar lipídios como fonte de energia, embora sua capacidade em estocá-los seja alta (Bray, 1977).

A obesidade também está intimamente relacionada à ocorrência de doenças cardiovasculares. Em humanos, o *Framingham Heart Study* foi um dos primeiros grandes estudos em que dados antropométricos foram coletados e avaliados como preditores de doenças crônicas. Entre 1948-1951, mais de 5000 indivíduos de 35 a 75 anos de idade foram seguidos por um período de 44 anos. Neste estudo, a obesidade esteve independentemente associada a um maior risco para hipertensão, diabetes mellitus 2, e doenças cardiovasculares (Wilson, 2002). Dados americanos (NHANES) indicam que sobrepeso e obesidade estão associados a um aumento significativo na mortalidade por diabetes e doença renal (61.248 mortes), doença cardiovascular (112.159) e câncer (13.839) (Flegal et al., 2007).

Em estudos experimentais, a linhagem Zucker obesa é utilizada como modelo de síndrome metabólica, no entanto, as alterações relacionadas à função cardiovascular permanecem pouco exploradas. Alguns estudiosos consideram que os ratos Zucker obesos são modelos de hipertensão arterial, enquanto outros não verificaram essa alteração. Além da pressão arterial, a sensibilidade barorreflexa tem sido testada por ser um indicativo de complicações cardiovasculares, entre elas, a própria instalação da hipertensão arterial. Alguns estudos que realizam essa mensuração sugerem que a obesidade presente nesse modelo exerce influência na função vascular e por isso há redução na sensibilidade barorreflexa (Pamidimukkala e Jandhyala, 1996; Radulovacki et al., 1996; Schreihöfer et al., 2007). Até o presente momento, os resultados também são conflitantes, uma vez que há dúvidas se o prejuízo barorreflexo é devido a uma anormalidade genética relacionada à obesidade ou se a obesidade por si só é responsável por essa atenuação (Barringer e Buñag, 1989).

#### 1.4 Interação entre privação de sono e sistema cardiovascular

Dentre os muitos sistemas orgânicos que possuem uma forte relação com a perda de sono, o sistema cardiovascular ganha destaque. Dados recentes indicam que a PS aguda ou débito de sono cumulativo tem sido relacionados às doenças metabólicas e cardiovasculares e às causas de mortalidade (Wolk et al., 2005; Trenell et al., 2007), evidenciando que a duração do sono é essencial para uma vida saudável (Shamsuzzaman et al., 2003).

Embora seja fato que uma das funções do sono seja a restauração fisiológica, torna-se claro que o sono normal é um processo complexo e dinâmico com efeitos profundos na homeostase cardiovascular, uma vez que é seu maior modulador em condições fisiológicas e patológicas (Wolk et al., 2005). Sabe-se que assim como o sistema nervoso, o sistema cardiovascular possui ampla participação em condições de estresse agudo e crônico, o que pode ser considerado fator de risco para o aumento da morbimortalidade por doença cardiovascular (Loures et al., 2002). Entretanto, a adequada comprovação científica deste fato somente vem sendo obtida mais recentemente.

A PS está associada com elevação na atividade simpática. A perda de sono deve estimular os níveis noturnos de catecolaminas e contribuir para doenças cardiovasculares (Nagai et al., 2010). Por outro lado, o aumento da atividade nervosa simpática contribui para o aumento das doenças relacionadas à PS (Nagai et al., 2010). Na *Alameda Country Study*, Wingard e Berkman (1983) investigaram o risco de mortalidade associada com diferente padrão de sonolência em 6.928 adultos. As análises indicaram que os índices de mortalidade de doenças isquêmicas cardiovasculares, câncer, infarto e todas as causas combinadas foram

menores para indivíduos que dormem 7 ou 8 horas por noite. Homens que dormem 6 horas ou menos, ou 9 horas ou mais, tinham 1,7 vezes mais mortes do que aqueles que dormiam 7 ou 8 horas por noite.

Os efeitos da PS no perfil cardiovascular têm sido pouco descrito em modelos experimentais. No entanto, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que após 96 horas de privação de sono paradoxal (PSP) ocorrem alterações significativas nos parâmetros sanguíneos associados ao risco cardiovascular (Andersen et al., 2004a; Antunes et al., 2007). Assim, tendo em vista os resultados obtidos a respeito do conhecimento sobre a interação do sistema cardiovascular com a PS, torna-se evidente a necessidade da utilização de modelos animais para auxiliar na elucidação dos mecanismos minuciosos envolvidos nessa relação.

A PS pode exercer efeitos agudos e crônicos na fisiologia cardiovascular por meio de alterações no sistema nervoso autonômico (Shamsuzzaman et al., 2003). Algumas hipóteses sugerem que a ativação simpática vascular pode estar envolvida no aumento da pressão arterial após a PS. Possíveis anormalidades relacionadas à resposta barorreflexa cardíaca podem contribuir para esse aumento (Shamsuzzaman et al., 2003; Everson et al., 2005). Em 1855, Moreg descreveu uma relação inversa entre a pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC), o chamado reflexo barorreceptor ou Lei de Moreg. As respostas ocorridas na FC causadas por meio da alteração na PA dependem de barorreceptores localizados no arco aórtico e seios carotídeos que detectam alterações na PA.

Por volta de 1920, Walter Cânon definiu que a manutenção do equilíbrio do organismo (homeostase) era função do sistema nervoso autonômico, por meio de 2 sistemas antagônicos (simpático e parassimpático). Por sua vez, o sistema nervoso

autônomo influencia tônica e reflexamente o sistema cardiovascular (De Angelis et al., 2004).

Os barorreceptores arteriais são terminações nervosas livres, densamente ramificadas, localizadas primordialmente nas paredes do arco aórtico (barorreceptores aórticos) e dos seios carotídeos (barorreceptores carotídeos). O principal mecanismo de ativação dos barorreceptores é a deformação mecânica das terminações neurais, decorrente da distensão da parede vascular determinada pela onda de pulso. Dessa forma, os barorreceptores constituem-se, em última análise, em mecanorreceptores. A função primordial dos barorreceptores é manter a PA estável, dentro de uma faixa estreita de variação, esteja o indivíduo em repouso ou desenvolvendo diferentes atividades comportamentais (exercício físico, mudanças de postura, sono, etc.). Eles exercem uma importante regulação reflexa da FC, débito cardíaco, contratilidade miocárdica, resistência vascular periférica e, conseqüentemente, distribuição regional do fluxo sanguíneo. Elevações súbitas da PA aumentam a atividade dos barorreceptores, os quais reflexamente inibem a atividade tônica simpática para os vasos e coração. A redução da atividade simpática e o aumento da atividade vagal tendem a produzir uma diminuição da resistência periférica total e do débito cardíaco, contribuindo, assim, para o retorno da PA aos níveis normais. O inverso também é verdadeiro, quando ocorrem quedas súbitas da PA.

Tanto animais como pacientes com hipertensão arterial apresentam atenuação importante da sensibilidade do reflexo pressorreceptor (Grassi e Mancia, 1994). As respostas reflexas de FC estão atenuadas não apenas para as alterações breves, mas também para as alterações longas de PA. Por exemplo, em ratos SHR,

um modelo espontâneo de hipertensão, foi verificado que a sensibilidade barorreflexa estava diminuída e que essa redução ocorreu progressivamente com a idade (Nagai et al., 2003; Corbett et al., 2007). Embora os barorreceptores sejam passíveis de adaptação, aguda ou cronicamente aos altos níveis de pressão arterial, sua função na patogênese da hipertensão arterial tem sido estudada desde a década de 20 com os estudos de Hering-Breuer (Moore, 1927; Heymans e Bouckaert, 1930).

Além da hipertensão, estudos clínicos têm mostrado que em pacientes infartados a sensibilidade reduzida do barorreflexo estava associada com mortalidade mais elevada (La Rovere et al., 1998; 2001). Essas informações somadas à vasta literatura já existente, relacionando desvios da sensibilidade do barorreflexo e hipertensão arterial, mostram a potencialidade dessa medida como marcador da função autonômica em diferentes grupos de pacientes (Haibara e Santos, 2000).

### 1.5 Diferenças sexuais no controle cardiovascular e no sono

A diferença entre a duração e a qualidade do sono em homens e mulheres (Silva et al., 2008; Kuriyama et al., 2011) sugere que pode haver influência do sexo na relação entre o sono e o controle metabólico (Trenell et al., 2007). Mulheres apresentaram aumento mais acentuado no sono de ondas lentas após 40 horas de privação total de sono quando comparadas aos homens; indicando que elas apresentam uma resposta mais acentuada à PS (Armitage et al., 2001, Silva et al., 2008). Essas características distintas podem ser exploradas pelas concentrações de hormônios sexuais como já explicado e/ou fatores secundários, como a distribuição de gordura regional (Trenell et al., 2007).

Tem-se observado um aumento na incidência de fatores de risco em mulheres que talvez possa explicar a alta taxa de doenças cardiovasculares que tem sido observada neste sexo nos últimos anos. O mais comum fator de risco de doenças cardiovasculares em mulheres é a hipertensão. De fato, em torno dos 75 anos, 85% das mulheres nos Estados Unidos têm hipertensão de acordo com o *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure* (Lee e Foody, 2011).

As queixas de sono se acentuam com a menopausa aumentando o risco cardiovascular igualando o risco observado em homens (Meagher, 2004). Isso porque ao entrar na menopausa, o organismo feminino passa por um conjunto de alterações psíquicas, físicas e ainda hormonais. Mais especificamente, ocorre diminuição acentuada das concentrações de progesterona e estrogênio (Greenspan, 2000) e aumento do colesterol total, do LDL e dos triglicérides (Stevenson et al., 1993; Kannel et al., 1995) aumentando o risco de desenvolver doenças



cardiovasculares. O aumento do colesterol total, do LDL e dos triglicérides na menopausa pode ser conseqüente das alterações hormonais que ocorrem nesse período, como por exemplo, a diminuição de progesterona e estrogênio (Greenspan, 2000).

Sabe-se ainda que os efeitos periféricos da diminuição de estrogênio podem causar um aumento da incidência de doenças cardiovasculares (Laudanski et al., 2001) e as oscilações nas concentrações desse hormônio podem acarretar alterações em áreas do cérebro que participam da regulação do sistema cardiovascular (Saleh et al., 2000). Além disso, a diminuição de estrogênio após a menopausa contribui para a vasoconstrição vascular e para a ocorrência de alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona e nas vias sensíveis ao sódio (Schulman e Rajj, 2006; Ramirez-Expósito et al., 2008). Mulheres que foram acompanhadas pelo *Framingham Heart Study*, apresentaram a obesidade como fator de risco independente para diversas patologias cardiovasculares (Kannel, 2002). Especificamente nas mulheres de meia-idade observaram-se altas taxas de desenvolvimento das doenças cardiovasculares com apenas um pequeno aumento no peso corporal (Kannel, 2002). De fato, os estudos indicam que as mulheres a partir da menopausa apresentam maior risco cardiovascular do que os homens (Wingard et al., 1990). No entanto, com a entrada das mulheres no mercado de trabalho e, conseqüentemente, com maior exposição a fatores que contribuem para esse risco como estresse, fumo e maus hábitos alimentares inadequado, a taxa de mortalidade tem sido elevada mesmo antes da menopausa (Castanho et al., 2001).

No final da década de 90, Kuo e colaboradores (1999) demonstraram que mulheres na faixa etária de 40 a 49 anos apresentam maior atividade parassimpática

do que os homens. O sexo masculino demonstrou ter hiperatividade simpática comparativamente ao sexo oposto, sugerindo uma proteção cardiovascular do sexo feminino até essa faixa etária. Laitinen e colaboradores (1983) relataram que 24% das mulheres com mais de 40 anos de idade apresentavam uma marcante diminuição na sensibilidade barorreflexa, confirmando que a idade e o sexo têm um significativo impacto no controle do sistema nervoso autônomo sobre a função cardiovascular.

Assim como em humanos, a PSP em animais têm efeito significativo, porém fisiologicamente heterogêneo em machos e fêmeas (Lee e Foody, 2011), sendo que em ratos machos alguns efeitos associados ao risco de doenças cardiovasculares podem ser intensificados (Antunes et al., 2007).

*Justificativa*

## 2.0 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade nas sociedades ocidentais. Por esse motivo, diversas estratégias terapêuticas têm sido implantadas nas últimas décadas, no entanto, parecem ainda insuficientes em virtude da sua alta prevalência. Uma possível razão para falhas na efetividade das estratégias empregadas pode ser a falta de conhecimento sobre alguns importantes fatores de risco. Ainda, há muitas interações fisiopatológicas entre o sono e o sistema cardiovascular.

Outro fator de risco independente para a ocorrência dessas doenças é a obesidade. Tanto a privação de sono quanto a obesidade exercem marcantes influências quando ocorrem isoladamente, porém pouco é conhecido sobre os efeitos sinérgicos destes fatores de risco quando estão associados ao longo da vida.

Além desses fatores, a privação de sono pode exercer efeitos completamente distintos em razão do sexo, principalmente no que se refere ao sistema cardiovascular que conta com a modulação hormonal. Assim, modelos animais podem auxiliar elucidando processos mecaniscísticos em situações pré-clínicas, fornecendo evidências para a elaboração e aplicação de tratamentos. Fundamentados em abordagens terapêuticas, o conhecimento sobre os principais fatores de risco poderia reduzir o risco cardiovascular contribuindo para a melhor qualidade de vida dos indivíduos.

# *Objetivos*

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar os efeitos das privações de sono aguda e crônica sobre os parâmetros cardiovasculares em ratos machos e fêmeas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

O objetivo geral foi subdividido nos objetivos específicos citados a seguir:

1. Examinar a associação entre os fatores de risco: privação de sono, obesidade e idade sobre os parâmetros cardiovasculares.
2. Investigar a influência da privação de sono paradoxal e da restrição crônica de sono crônica sobre os parâmetros cardiovasculares e hormonais em ratos eutróficos machos e fêmeas.
3. Verificar se há relação entre a disfunção barorreflexa e o desenvolvimento da hipertensão arterial.

*Método*

## 4.0 MÉTODO

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (32 machos e 64 fêmeas) e da linhagem Zucker (120 fêmeas) procedentes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME-UNIFESP). Os animais da linhagem Wistar foram mantidos em gaiola individuais e os da linhagem Zucker em gaiolas coletivas (3 animais/gaiola). O estudo foi conduzido em condições de luz (claro das 7h às 19h) e temperatura ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) controladas automaticamente. A limpeza das gaiolas foi feita 3 vezes/semana. Ração e água foram mantidos à vontade nas gaiolas. Os experimentos foram conduzidos segundo princípios éticos e sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (Processo CEP nº 1268/08). Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos segundo os Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação (Andersen et al., 2004b).

O máximo de esforço foi despendido para minimizar possíveis desconfortos causados aos animais. Além disso, em todos os experimentos do presente trabalho buscou-se empregar a filosofia dos “3Rs”, que tem como objetivo reduzir o tamanho da amostra sem comprometer as análises estatísticas e interpretação dos resultados.

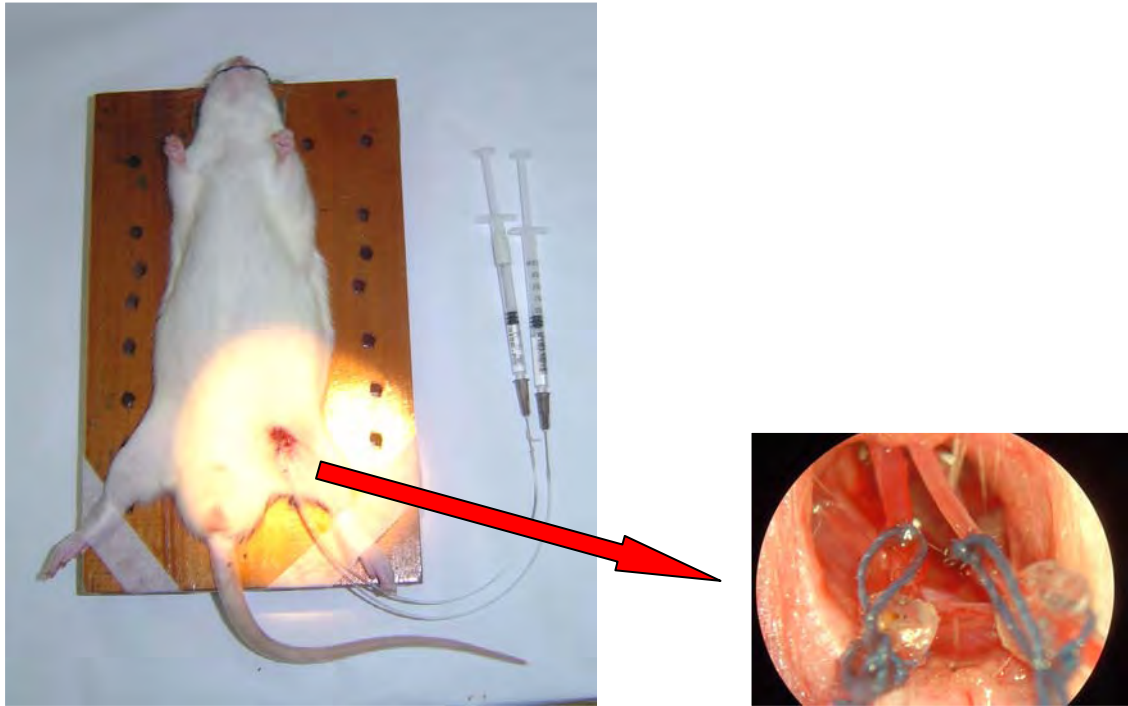


## 4.2 Esfregaço vaginal

A fim de verificar se as ratas apresentavam ciclo estral regular, foi realizado o esfregaço vaginal por 2 ciclos consecutivos, o que corresponde a aproximadamente 10 dias. Esse procedimento consistiu na introdução de salina na abertura vaginal, utilizando um conta-gotas e uma pipeta de 200 $\mu$ l. A salina foi retirada após alguns instantes e espalhada sobre a lâmina para a identificação do tipo celular predominante em cada fase do ciclo. A leitura foi feita logo após a coleta do material utilizando o microscópio com aumento de 40x. Todas as ratas iniciaram a PS quando estavam nas fases diestro do ciclo estral, uma vez que nosso grupo demonstrou que esta foi a fase em que a PS exerceu as mais proeminentes alterações (Antunes et al., 2006).

## 4.3 Instrumentação cirúrgica para aquisição dos parâmetros cardiovasculares

Após o período experimental, os animais foram inicialmente anestesiados pela inalação de halotano (5%) e foram mantidos sob uma mistura de 3% de halotano com 100% de O<sub>2</sub> para a introdução de cateteres na artéria e veia femorais objetivando o registro direto da pressão arterial (PA) e a infusão de drogas intravenosa, respectivamente (Figura 1). Desse modo, artéria e veia femorais foram dissecadas com tesoura de ponta fina e em cada uma foi introduzido um cateter (tubos de polietileno PE-10 [Clay Adams<sup>®</sup>, Parsipanny, NJ, EUA], previamente conectado a um tubo de polietileno PE-50, com comprimento ajustado ao tamanho do animal). Foi feita a devida assepsia e após os animais retornarem da anestesia, seguiram para a próxima etapa de experimentos.



**Figura 1-** Canulação de artéria e veia femoral.

Para avaliar o controle barorreflexo da FC foram realizadas infusões em bôlus de fenilefrina ( $3\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $10\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.) e nitroprussiato de sódio ( $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $15\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $20\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.) em doses aleatórias, a fim de obter efeitos pressores e depressores respectivamente induzidos por essas drogas vasoativas nos ratos acordados. As variações de FC foram divididas pelas variações de PA para cada concentração de droga vasoativa obtendo dessa forma, ganho barorreflexo expresso em  $\text{bat}/\text{mmHg}$  (Farah et al., 1999). Para a realização da análise estatística dos dados foi realizada a média das respostas entre as 3 concentrações de fenilefrina bem como a média entre as 3 concentrações de nitroprussiato de sódio.

#### **4.4 Artigo 1:** *Influence of sleep deprivation on cardiovascular parameters in female Zucker obese and lean rats (em revisão).*

##### **4.4.1 Grupos experimentais:**

Os animais da linhagem Zucker foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais para as idades de 3, 6 e 15 meses.

a) *Magro - CTRL:* animais magros (Fa/?) controles (CTRL) mantidos em suas gaiolas de moradia.

b) *Obeso - CTRL:* animais obesos (fa/fa) controles (CTRL) mantidos em suas gaiolas de moradia.

c) *Magro - PS:* animais magros (Fa/?) submetidos à privação de sono por 6 horas.

d) *Obeso - PS:* animais obesos (fa/fa) submetidos à privação de sono por 6 horas.

##### **4.4.2 Privação de sono aguda**

Os animais foram submetidos a um episódio de privação de sono contínua durante as primeiras 6 horas de fotoperíodo claro (período de sono típico para ratos, das 7 às 13 horas). A PS foi conduzida pelo método do *gentle handling*, introduzindo um objeto (palito) dentro da gaiola e batendo na gaiola se os animais apresentassem sonolência. Os animais não foram incomodados durante a alimentação ou quando bebiam água (Papale et al., 2010). Além disso, o método convencional de PS (o qual utiliza uma plataforma específica para ratos eutróficos) não foi utilizado para os ratos

da linhagem Zucker porque aqueles que fossem obesos teriam dificuldade para permanecerem sobre a estreita plataforma.

#### **4.4.3 Análise estatística**

Todos os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade e homogeneidade das amostras por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Quando os dados não eram homogêneos ou normais, foram transformados em Z-escore para que fosse possível a utilização de um teste paramétrico.

Para nos certificarmos sobre a obesidade dos animais o teste *t* Student foi utilizado para comparar o peso corporal de ratos magros e obesos em cada idade. A análise de variância de 2 vias (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan (quando necessário) foi utilizada para comparar entre os fatores grupo (CTRL e PS) e condição (magro e obeso) para cada idade independentemente (3, 6 e 15 meses). Essas análises foram utilizadas para verificar diferenças na pressão arterial, frequência cardíaca e resposta barorreflexa bradicárdica e taquicárdica. Os resultados foram apresentados nas figuras e no texto como média±desvio-padrão e o nível de significância estabelecido foi de  $p \leq 0,05$ .

#### **4.5 Artigo 2:** *Cardiovascular and hormonal alterations after sleep loss in rats (submetido).*

##### **4.5.1 Grupos experimentais**

Os ratos da linhagem Wistar foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais:

- a) *CTRL*: animais controles (*CTRL*) mantidos em suas gaiolas de moradia.
- b) *PSP*: animais submetidos à privação de sono paradoxal (*PSP*) por 96 horas.
- c) *RS*: animais submetidos à restrição parcial crônica de sono (*RS*) por 21 dias.

##### **4.5.2 Privação de sono paradoxal (PSP)**

Os animais da linhagem Wistar foram submetidos à privação de sono paradoxal (*PSP*) por 96h consecutivas pelo método da plataforma única que consiste em colocá-los sobre uma plataforma circular de 6,5 cm de diâmetro e 8 cm de altura em gaiolas individuais (23 x 23 x 29 cm) com água. A atonia muscular presente no sono paradoxal faz com que o animal acorde ao encostar as narinas, ou ainda, o corpo inteiro na água. Nosso grupo demonstrou que durante o período de privação de sono os animais submetidos ao método da plataforma apresentaram uma redução total do sono paradoxal e uma diminuição de 37% do tempo total de sono de ondas lentas (Machado et al., 2004).

Durante todo o período de *PSP*, a sala foi mantida em condições de temperatura constante ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e sob um ciclo claro-escuro de 12h, iniciando-se a

fase clara às 7:00h da manhã. A ração e a água foram fornecidas *ad libitum* por meio da grade localizada sobre a gaiola durante todo o período experimental.

#### **4.5.3 Restrição de sono (RS)**

Os animais da linhagem Wistar pertencentes a este experimentos foram submetidos à PS por meio do método da plataforma única por 18h (início às 16h) durante 21 dias. Após cada período de 18h de PSP, os animais foram permitidos dormir por 6h (janela de sono iniciando às 10h). A escolha desse intervalo de tempo (10h às 16h) deve-se ao fato de ser o período quando o sono paradoxal atinge sua maior concentração e o sono de ondas lentas (SOL) é estabilizado (Machado et al., 2005).

#### **4.5.4 Coleta de sangue**

Ao final de cada experimento, um grupo adicional de animais foi submetido à decapitação em uma sala adjacente para a coleta de sangue em tubos de vidro específicos contendo EDTA. Após a coleta, os tubos foram centrifugados a 3.500 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi pipetado e armazenado em tubos menores a temperatura -80°C até a realização da análise.

#### **4.5.5 Análise hormonal**

As concentrações de ACTH (6,8%) foram determinadas em plasma com EDTA. Esta medida foi realizada no analisador IMMULITE 2000 (DPC Immulite, Los Angeles, CA, EUA) e trata-se de um ensaio imunométrico quimioluminescente direto. A sensibilidade da análise é de 5 pg/ml. O princípio do método é a reação entre antígeno e anticorpo tendo como marcador a fosfatase alcalina. Esta reação

hidrolisa o substrato quimioluminescente gerando um produto instável, o qual após estabilização gera a emissão de fótons de luz (amplificados) que é medida através de um fotomultiplicador, o qual tem função de transformar a luz emitida pelos fótons em impulsos elétricos. Estes impulsos são lidos em “contagens” de luz por segundo (cps). Antes da dosagem, as amostras foram descongeladas em banho de gelo e mantidas permanentemente a 4°C ou menos. O volume da amostra utilizado foi de 200 µl. Essas dosagens foram realizadas no Laboratório da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP).

#### 4.5.6 Análise estatística

Todos os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade e homogeneidade das amostras por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Quando os dados não eram homogêneos ou normais, foram transformados em Z-escore para que fosse possível a utilização de um teste paramétrico. A análise de variância de 2 vias (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan (quando necessário) foi utilizada para comparar entre os fatores grupo (CTRL, PSP e RS) e sexo (macho e fêmea) bem como a interação entre esse 2 fatores. O teste *post hoc* de Duncan foi usado para analisar as diferenças entre os grupos para analisar as variáveis de ACTH, pressão arterial média, frequência cardíaca, resposta bradicárdica e resposta taquicárdica. Para verificar as diferenças entre o peso corporal (antes e após o período respectivo) nos grupos CTRL (gaiola-moradia), PSP ou RS foi utilizada para cada sexo, independentemente, ANOVA para amostras repetidas. Os resultados foram apresentados nas figuras e no texto como média±desvio-padrão e o nível de significância estabelecido foi de  $p \leq 0,05$ .

# *Resultados*



*Artigo I*  
*(Submetido: Obesity)*

## RESUMO

**INFLUÊNCIA DA PRIVAÇÃO DE SONO NOS PARÂMETROS  
CARDIOVASCULARES EM RATAS ZUCKER MAGRAS E OBESAS**

A associação recíproca entre a duração do sono e o ganho de peso tem sido explorada. No entanto, as consequências destes fatores sobre o sistema cardiovascular ainda não estão totalmente elucidadas ao longo da vida. Nesse sentido, nós examinamos o impacto da privação de sono aguda (PS) na sensibilidade do barorreflexo e da pressão arterial em ratos Zucker de diferentes idades. Ratas Zucker magras e obesas de 3, 6 e 15 meses de idade foram distribuídos em PS ou controle (CTRL). Após o protocolo de PS (6 horas de manuseio suave) ou um intervalo de tempo equivalente para ratos CTRL, os animais foram anestesiados para a cirurgia de cateterismo da artéria e da veia femoral. Para avaliar o índice de sensibilidade do barorreflexo, infusões de fenilefrina (resposta bradicárdica) e nitroprussiato de sódio (resposta taquicárdica) foram administrados. A obesidade resultou em disfunção da resposta taquicárdica do barorreflexo cardíaco desde 3 meses de idade. Aos 6 e 15 meses de idade, as respostas bradicárdica e taquicárdica foram significativamente menores nos animais obesos em comparação com os respectivos grupos magros. Aos 15 meses de idade, as interações entre obesidade, PS e envelhecimento provocaram as piores consequências no sistema cardiovascular, uma vez que aumentou a pressão arterial média, a frequência cardíaca e reduziu a sensibilidade do barorreflexo. Além disso, os resultados sugerem que não há relação direta entre o desequilíbrio do barorreflexo e aumento na pressão arterial.

**Influence of Sleep Deprivation on Cardiovascular Parameters in  
Female Zucker Obese and Lean Rats**

Neuli M. Tenório<sup>1</sup>, Sergio Tufik<sup>1</sup>, Cássia T. Bergamaschi<sup>2</sup>, Ruy R. Campos<sup>2</sup>,  
Fátima Cintra<sup>1</sup>, Monica L. Andersen<sup>1</sup>

Departamento de Psicobiologia<sup>1</sup> e Fisiologia<sup>2</sup>, Universidade Federal de Sao Paulo  
(UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

**Running title:** Sleep deprivation in Zucker rats

**Corresponding author:**

Monica L. Andersen  
Rua Napoleão de Barros, 925  
Vila Clementino - SP- 04024-002  
São Paulo - Brazil  
Phone # (55-11) 2149-0155  
Fax # (55-11) 5572-5092  
e-mail address: mandersen@psicobio.epm.br

## **Abstract**

The reciprocal association between sleep duration and weight gain have been explored. However, the consequences of these factors on cardiovascular system are still not fully elucidated across life span. We examined the impact of acute sleep deprivation (SD) on baroreflex sensitivity and blood pressure in Zucker rats of different ages. Female lean and obese Zucker rats at 3, 6 and 15 months of age were assigned to SD or control (CTRL) protocol. After the SD procedure (6 hours of gentle handling) or an equivalent time span for unhandled CTRL rats, the animals were anesthetized for surgical catheterization of the femoral artery and femoral vein. To evaluate the baroreflex sensitivity index, bolus infusions of phenylephrine (bradycardia response) and sodium nitroprusside (tachycardia response) were administrated. The obesity resulted in tachycardia response dysfunction since 3 months of age. At 6 and 15 months-old, bradycardia and tachycardia responses were significantly lower in obese animals compared to respectively lean groups. At 15 months of age, the interactions among obesity, SD and aging evoked the greatest consequences at cardiovascular system since increased mean arterial pressure, heart rate and decreased baroreflex sensitivity were observed. Thus, the results suggest that there is no direct relation between baroreflex imbalance and increase at arterial pressure.

**Key words:** Obesity, aging, sleep deprivation, baroreflex sensitivity, blood pressure, Zucker female rats.

## INTRODUCTION

Modern living involves several stressful factors that can individually and collectively curtail optimal sleep. In addition, studies have shown a close relationship between sleep deprivation (SD) and obesity (1,2). For example, Patel and colleagues (3) reported that individuals who slept 5 hours or less weighed approximately 2.47 kg more than those who slept 7 hours. It is known that weight gain can have important negative health effects, especially upon the cardiovascular system (4,5).

The association between sleep loss and cardiovascular disease may be due to acute and chronic effects of altered autonomic nervous system activity upon cardiovascular physiology (6). Some hypotheses suggest that vascular sympathetic activation may be involved in increased blood pressure after SD, in part due to abnormalities of the baroreflex control response (6,7). The cardiac baroreflex plays a critical role in the acute regulation of sympathetic vasomotor activity and arterial pressure, but its importance in the long-term control of these parameters is still controversial (8). Previous findings indicate that baroreflexes chronically influence the degree of sympathetic activity, and that baroreflex dysfunction could contribute significantly to chronic sympathetic activation and the resulting hypertension (9).

Notably, women generally have greater fat mass than men and appear to be more affected by SD (10-12). Thus, the consequences of SD may be more deleterious for women, as obesity is associated with changes in the autonomic regulation of arterial pressure and vascular reactivity to sympathetic stimulation (13).

The effects of obesity and SD are typically investigated independently. Accordingly, the association between these factors has not been thoroughly explored, though such studies may provide information relevant to health and

disease throughout the life span. Normal aging is a universal phenomenon that is accompanied by a complex series of changes in the autonomic control of the cardiovascular system. These changes favor heightened cardiac sympathetic tone with parasympathetic withdrawal by blunting cardiovagal baroreflex sensitivity (14). The Zucker obese rat demonstrates cardiovascular dysfunction with increasing age (15), however, studies have been using only rats around 2 months-old. Although the effect of aging on the sympathetic nervous system has been investigated, conflicting data have been reported in Zucker rats.

Genetically obese rodent models have been widely used to understand the etiology of obesity. Although obese animals cannot serve as exact models of the human condition, they have provided important insights into the causes of human obesity and possible consequences. The Zucker-fatty rat appeared as a result of a spontaneous mutation. The obesity is transmitted as an autosomal Mendelian recessive trait and the homozygous animals are hyperphagic suffering the consequences of genetic obesity. Zucker obese rats accumulate fat progressively throughout their lives and show some abnormalities such as hyperinsulinemia (16) insulin resistance, hyperlipemia (17), increased efficiency for food utilization and decreased in physical activity (18).

Therefore, the purpose of this study was to investigate the impact of singular and multiple cardiovascular risk factors (SD, obesity and aging) on baroreflex sensitivity and cardiovascular parameters in lean and obese female Zucker rats. The results could identify which factors are associated with baroreflex dysfunction and hypertension in this animal model of obesity.

## **METHODS AND PROCEDURES**

### **Animals**

Experiments were performed on female lean and obese Zucker rats provided by the Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) of Universidade Federal de São Paulo. The animals were housed in groups of 3 in standard polypropylene cages, maintained at 22°C with a 12:12 hours light-dark cycle (lights on at 7 am), and allowed free access to food and water. The rats were maintained and treated in accordance with the guidelines established by the Ethical and Practical Principles for the Use of Laboratory Animals (19). All animal procedures were approved by the University Ethics Committee (Protocol #1268/08).

### **Acute Sleep Deprivation**

The animals in the present study were subjected to a single episode of continuous SD during the first 6 hours of the light photoperiod, which is the typical sleeping period for rats (7 am to 1 pm). The SD was carried out by gentle handling method, introducing an object (a pick) into the cage and tapping the cages whenever the animals appeared drowsy. The animals were not disturbed during feeding and drinking (20). Additionally, the platform technique of SD was not a preferred method since obese rats would have difficulty navigating a narrow platform as required by the platform technique protocol.

## Experimental Design

Female lean and obese Zucker rats at 3, 6 and 15 months of age were randomly assigned to either the control (CTRL) or SD protocol (n=8 to 9 rats per group). All rats started the experiments in the diestrus phase of the estrous cycle since we previously demonstrated that this phase is particularly affected by SD (21).

SD-assigned rats were handled gently for 6 hours, while CTRL-assigned rats were allowed to sleep. After the single SD period, all animals were submitted to surgical vascular catheterization. The rats were initially anesthetized by halothane inhalation (5%) and were maintained in a mix of 3% halothane with 100% O<sub>2</sub>. Tapered polyethylene catheters (PE-50) were placed in the right femoral artery to monitor arterial pressure and in the right femoral vein to infuse drugs (sodium nitroprusside and phenylephrine).

After the animals returned to their normal physiological functions (minimum 30 min after catheterization), baseline values of mean arterial pressure and heart rate were recorded in conscious and freely moving rats. The arterial pressure was measured using a Powerlab Data Acquisition System (PowerLab/8SP; ADInstruments, Inc., Colorado Springs, CO, USA) connected to a pressure transducer (BP-100RE; CB Sciences, Dover, NH, USA) with an acquisition frequency of 2 kHz. Then, each animal received 3 bolus injections (0.1 ml) of phenylephrine (30, 50 and 100 µg/ml) and sodium nitroprusside (50, 150 and 200 µg/ml) in random order.

The changes between basal and peak values of the mean arterial pressure and the changes in heart rate reflex in response to pressor (phenylephrine-bradycardia response) and depressor (sodium nitroprusside-tachycardia response)



injections were used to quantify baroreflex sensitivity (beats/mmHg) through the  $\Delta\text{HR}/\Delta\text{MAP}$  ratio for each animal.

### **Statistical Analysis**

Initially, homogeneity of variance tests was used by Levene test and normal distribution of data by Kolmogorov-Smirnov test in all analyses. When these tests showed absence of homogeneity and normality, data were Z-score transformed. Student's t test was used to compare body weight between lean and obese rats each age. A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* Duncan test was used to compare groups (CTRL and SD) and condition (lean and obese) for each age independently (3, 6 and 15 months-age). These analyses were used to verify differences in the mean arterial pressure, heart rate and baroreflex gain (bradycardia and tachycardia response).

## RESULTS

### a) Cardiovascular parameters in lean and obese CTRL and SD female rats at 3 months-old

As expected, adult obese rats showed a significant increased body weight compared to the lean group ( $404.0 \pm 35.8$  vs.  $205.3 \pm 16.2$  g, respectively;  $P \leq 0.001$ ). However, the body weight was not changed after the SD condition in both lean and obese rats.

As depicted in Table 1, the mean arterial pressure values were significantly higher in obese-CTRL than lean-CTRL rats ( $112.8 \pm 4.8$  vs.  $101.1 \pm 9.8$  mmHg, respectively;  $P \leq 0.01$ ) and in lean-SD rats compared to respective lean-CTRL group ( $111.7 \pm 6.5$  vs.  $101.1 \pm 9.8$  mmHg, respectively;  $P \leq 0.01$ ). Furthermore, no significant changes were found among the groups for the heart rate.

The bradycardiac response evoked by baroreflex activation during the phenylephrine-induced arterial pressure rise was attenuated in obese-SD rats compared to respective CTRL group ( $-1.1 \pm 0.4$  vs.  $-2.5 \pm 0.3$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.001$ ). Moreover, the association of SD and obesity resulted in significant baroreflex imbalance in obese-SD compared to lean-SD rats ( $-1.1 \pm 0.4$  vs.  $-2.7 \pm 0.8$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.001$ ).

The SD decreased significantly the sympathetic baroreflex sensibility in obese-SD rats compared to CTRL group ( $-0.6 \pm 0.3$  vs.  $-1.8 \pm 0.7$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.001$ , Fig. 1B). This parameter was also significantly decreased in obese-SD group compared to lean-SD ( $-0.6 \pm 0.3$  vs.  $-1.4 \pm 0.5$ , respectively;  $P \leq 0.01$ ).

**b) Cardiovascular parameters in lean and obese CTRL and SD female rats at 6 months-old**

Similarly to the young rats, the significant increased weight of the adult obese rats compared to the lean rats ( $544.3 \pm 56.6$  vs.  $241.4 \pm 23.4$  g, respectively;  $P \leq 0.001$ ) was not changed after SD condition.

Mean arterial pressure was significantly higher in the obese-CTRL rats than in the lean-CTRL group ( $116.0 \pm 6.8$  vs.  $103.9 \pm 5.4$  mmHg, respectively;  $P \leq 0.001$ ). In the obese-SD rats this parameter was significantly lower compared to obese-CTRL ( $110.1 \pm 1.5$  vs.  $116.0 \pm 6.8$  mmHg, respectively;  $P \leq 0.05$ , Table 1).

The heart rate was significantly lower in lean-SD group in relation to lean-CTRL rats ( $375.8 \pm 14.6$  vs.  $418.0 \pm 17.8$  bpm, respectively). The SD lead to significant higher levels of heart rate in obese rats compared to lean-SD group ( $413.8 \pm 19.4$  vs.  $375.8 \pm 14.6$  bpm, respectively;  $P \leq 0.01$ ).

The bradycardic response evoked by baroreflex activation during the phenylephrine-induced arterial pressure rise was attenuated in obese-CTRL group compared to lean-CTRL rats ( $-1.3 \pm 0.6$  vs.  $-2.1 \pm 0.5$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.01$ ). Similarly, obesity associated to SD caused baroreflex imbalance compared to lean-SD rats ( $-1.7 \pm 0.3$  vs  $-2.4 \pm 0.1$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.01$ ), as shown in Figure 2A.

The baroreflex gain was also attenuated in the tachycardia response to reduction of blood pressure with sodium nitroprusside in obese-CTRL compared to lean-CTRL ( $-1.3 \pm 0.4$  vs  $-3.3 \pm 0.5$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.01$ ) as well as in obese-SD compared to lean-SD ( $-1.2 \pm 0.5$  vs  $-2.8 \pm 0.1$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.01$ ). This parameter was also significantly decreased in lean-SD group compared to

lean-CTRL group ( $-2.8 \pm 0.1$  vs.  $-3.3 \pm 0.5$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.05$ ).

**c) Cardiovascular parameters in lean and obese CTRL and SD female rats at 15 months-old.**

Likewise previous ages, there was a statistical increased weight of the adult obese rats compared to the lean rats ( $747.0 \pm 42.3$  vs.  $259.2 \pm 45.6$  g, respectively;  $P \leq 0.001$ ). However, SD condition did not change the body weight significantly.

Mean arterial pressure was significantly higher in lean-SD group compared to lean-CTRL rats ( $111.7 \pm 6.5$  vs.  $100.0 \pm 11.7$  mmHg, respectively;  $P \leq 0.01$ ). Similarly, obese-SD rats presented an increase in mean arterial pressure compared to obese-CTRL group ( $113.9 \pm 4.9$  vs.  $101.3 \pm 10.8$  mmHg; respectively;  $P \leq 0.01$ , Table 1).

The heart rate was increased in lean-CTRL compared to obese-CTRL group ( $400.3 \pm 7.2$  vs.  $361.6 \pm 49.3$  bpm, respectively;  $P \leq 0.05$ ) whereas obese-SD group also presented significantly higher heart rate compared to obese-CTRL rats ( $422.9 \pm 24.6$  vs.  $361.6 \pm 49.3$  bpm, respectively;  $P \leq 0.001$ , Table 1).

As depicted in Figure 3A, the baroreflex sensibility evaluated by the bradycardic responses to arterial pressure changes was significantly decreased in obese-CTRL compared to lean-CTRL group ( $-0.8 \pm 0.3$  vs.  $-2.2 \pm 0.3$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.001$ ) as well as in obese-SD compared to lean-SD ( $2.7 \pm 0.9$  vs.  $-1.8 \pm 0.3$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.001$ ).

Analysis of tachycardic response evoked by baroreflex activation during sodium nitroprusside administration revealed a marked effect of obesity since the baroreflex gain in obese-CTRL was lower than lean-CTRL rats ( $-0.8 \pm 0.1$  vs.  $-2.1 \pm 0.4$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.001$ ). When obesity was associated with SD

condition, it was observed a significantly lower compared to obese-CTRL rats ( $-0.6 \pm 0.3$  vs.  $-0.8 \pm 0.1$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.001$ ). In addition, SD significantly reduced baroreflex response in lean-SD rats compared to lean-CTRL group ( $-1.4 \pm 0.5$  vs.  $-2.1 \pm 0.4$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.001$ ) as well as in obese-SD compared to obese-CTRL animals ( $-0.6 \pm 0.3$  vs.  $-0.9 \pm 0.1$  beats/mmHg, respectively;  $P \leq 0.001$ ).

## DISCUSSION

Among the risk factors analyzed (SD, obesity and aging), obesity exerted the greatest effect towards cardiovascular autonomic imbalance. The sympathetic dysfunction started since 3 months of age in obese rats. When the risk factors were verified isolately, the obesity exerted the greatest effect towards cardiovascular parameters compared to SD effects at 6 and at 15 months-old. However, the interaction between obesity and SD caused injuries more significantly in the oldest animals. In relation to mean arterial pressure, the effect of risk factors was associated to age condition. Thus, at 3 and 6 months-old, obesity evoked an elevated mean arterial pressure in CTRL rats. At 15 months-old, SD evoked higher mean arterial pressure levels in obese and in lean rats.

It has been documented that increased body weight is associated with changes in the autonomic control of the cardiovascular system (22). Obese individuals suffer from an increased mortality risk, supposedly due to cardiovascular disorders related to either continuously lowered parasympathetic or altered sympathetic activation (23). Hirsch et al. (24) described an inverse relationship between the amount of weight gain and the resulting decrease in parasympathetic control. The protein hormone leptin could be related to this effect, as obese Zucker rats have high plasma leptin (25,26). Leptin alters satiety and contributes to hyperphagia and weight gain. However, the neuroendocrine regulation of appetite and food intake also appears to be influenced by sleep duration, and sleep restriction may favor the development of obesity. In fact, sleep plays an important role in energy balance (27). A recent epidemiological study has indicated a distinct relationship between sleep duration and body weight (28). Cardiovascular disturbances have

been suggested to affect endothelial function during both short and prolonged SD (29,30). Furthermore, it is known that obesity is characterized by sympathetic nervous system activation, and there is considerable evidence that this system plays an important role in the initiation and maintenance of hypertension (31).

Baroreflex dysfunction started at 3 months of age in obese rats lead to increase at mean arterial pressure when the rats reached 15 months of age. However, obese-CTRL group did not show increase in the mean arterial pressure at 15 months-old even with a clear evident baroreflex imbalance since the early stage of 6 months of age. In contrast, SD at 15 months-old increased significantly the mean arterial pressure in lean animals; however the baroreflex dysfunction was altered only in the tachycardia response. Taking together, these data suggest that there is no directly relation between baroreflex imbalance and increase at arterial pressure. The hyporesponsive cardiac baroreflex itself represents a negative prognostic factor in cardiovascular diseases and important marker of low survival independent of baseline hemodynamic findings (32).

Several studies indicate that baroreflex resetting is incomplete in hypertension (9,33,34) and that baroreflex suppression of sympathetic activity is a sustained response that may serve as a compensatory mechanism to attenuate the severity of hypertension (9). Of note, current dogma implies that the baroreflex is relatively unimportant in the long-term control of arterial pressure (35).

In the present study, we measured blood pressure at minimum 30 min after surgical implantation of the femoral artery catheters, and it is possible that the baroreflex imbalance in the obese rats could be a consequence of greater reaction to the surgical stress. However, we observed no evidence of postoperative pain or

suffering in either the lean or obese rats. Indeed, the duration of surgery and of recovery from anesthesia was similar in both groups. The overall appearance and behavior of the obese rats were also similar to the lean rats.

Of note, we demonstrated that risk factors obesity, SD and aging were detrimental to the cardiovascular system, the first having led to the worst damage of the kind. In the young animals, SD alone did not alter any of the cardiovascular parameters under scrutiny but an aging subject readily produced an added effect in cardiovascular risk, an aspect that could be attributed to compensation reflexes typically observed in the old group. Moreover, the present study supports the hypothesis that baroreflex dysfunction may not contribute directly to chronic sympathetic activation in hypertension, as baroreflex function is mainly involved in the short-term neural regulation of blood pressure.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from the Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (CEPID #98/14303-3). ST, MLA, CTB and RRC are recipients of the fellowships from CNPq.

## **DISCLOSURE**

The authors declared no conflict of interest.



---

**REFERENCES**

1. Knutson KL, Lauderdale DS. Sleep duration and overweight in adolescents: self-reported sleep hours versus time diaries. *Pediatrics* 2007;119:1056-1062.
2. Javaheri S, Storfer-Isser A, Rosen CL, Redline S. Sleep quality and elevated blood pressure in adolescents. *Circulation* 2008;118:1034-1040.
3. Patel SR, Malhotra A, White DP, Gottlieb DJ, Hu FB. Association between reduced sleep and weight gain in women. *Am J Epidemiol* 2006;164:947-954.
4. Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increase adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance and dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 2009;9:26-32.
5. Kopalava ZD, Villeval de SV, Isikova KV. The role of adiponectin in development and progression of cardiovascular diseases. *Kardiologia* 2009;49:51-58.
6. Shamsuzzaman ASM, Caples SM, Somers VK. Sleep deprivation and circulatory control. *Sleep* 2003;26:934-936.
7. Everson CA, Laatsch CD, Hogg N. Antioxidant defense responses to sleep loss and sleep recovery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:374-383.
8. Lohmeier TE, Hildebrandt DA, Warren S, May PJ, Cunningham JT. Recent insights into the interactions between the baroreflex and the kidneys in hypertension. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol* 2005;288:828-836.
9. Lohmeier TE, Barrett AM, Irwin ED. Prolonged activation of the baroreflex: a viable approach for the treatment of hypertension? *Curr Hypertens Rep* 2005;7:193-198.

10. Benca RM, Schenck CH. Sleep and eating disorders. In: Kryger MH, Roth T Dement WC (eds). *Principles and practices of sleep medicine*. Elsevier: Philadelphia, 2005, pp 1337-1344.
11. Silva A, Andersen ML, De Mello MT *et al*. Gender and age differences in polysomnographies findings and sleep complaints in patients referred to a sleep laboratory. *Braz J of Med Biol Res* 2008;41:1067-1075.
12. Bittencourt LR, Santos-Silva R, Taddei JA *et al*. Sleep complaints in the adult Brazilian population: a national survey based on screening questions. *J Clin Sleep Med* 2009;5:459-463.
13. Lima DC, Silveira AS, Haibara AS, Coimbra CC. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metab Brain Dis* 2008;23:361-373.
14. Kaye DM, Esler MD. Autonomic control of the aging heart. *Neuromolecular Med* 2008;10:179-186.
15. Di Nardo F, Burattini R, Cogo CE, Faelli E, Ruggeri P. Age-related analysis of insulin resistance, body weight and arterial pressure in the Zucker fatty rat. *Experim Physiol* 2009;94:162-168.
16. Johnson FK, Johnson RA, Durante W *et al*. Metabolic syndrome increases endogenous carbon monoxide production to promote hypertension and endothelial dysfunction in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:601-608.
17. Argilés, JM. The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism. *Prog Lipid Res* 1989;28:53-66.

18. Bray GA. The Zucker-fatty rat: a review. *Federation Proceedings* 1977;36:148-153.
19. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM *et al.* *Princípios éticos e práticos do uso de animais de laboratório*. Universidade Federal de São Paulo: São Paulo, 2004, pp 18-33.
20. Papale LA, Paul KN, Sawyer NT *et al.* Dysfunction of the Scn8a voltage-gated sodium channel alters sleep architecture, reduces diurnal corticosterone levels, and enhances spatial memory. *J Biol Chem* 2010;285:16553-16561.
21. Antunes IB, Andersen ML, Baracat EC, Tufik S. The effects of paradoxal sleep deprivation on estrous cycles of the female rats. *Horm Behav* 2006;49:433-440.
22. Hofmann KL, Mussgay L, Ruddel H. Autonomic cardiovascular regulation in obesity. *J of Endocrinol* 2000;164:59-66.
23. Hubert HB, Feinleib M, MacNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968-977.
24. Hirsch J, Leibel R, Mackintosh R, Aguirre A. Heart rate variability as a measure of autonomic function during weight change in humans. *Regul Inte and Compreh Physiol* 1991;30:1418-1423.
25. Jin X, Fukuda N, Su J *et al.* Effects of leptin on endothelial function with OB-Rb gene transfer in Zucker fatty rats. *Atherosclerosis* 2003;169:225-233.
26. Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 2009;77:1053-1063.

27. Copinschi G. Metabolic and endocrine effects of sleep deprivation. *Essent Psychopharmacol* 2005;6:341-347.
28. Gangwisch JE, Malaspina D, Boden-Albala B, Heymsfield SB. Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES I. *Sleep* 2005;28:1289-1296.
29. Méier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N *et al.* Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:678-683.
30. Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B *et al.* Short sleep duration as a risk factor for hypertension: analyses of the first National Healthy and Nutrition Examination Survey. *Hypertension* 2006;47:833-839.
31. Esler M, Straznicky N, Eikelis N *et al.* Mechanisms of sympathetic activation in obesity-related hypertension. *Hypertension* 2006;48:1-10.
32. Mortara A, Rovere MTL, Pinna GD *et al.* Arterial baroreflex modulation of heart rate in chronic heart failure. *Circulation* 1997;96:3450-3458.
33. Head GA, Adams MA. Characterization of the baroreceptor heart rate reflex during development in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992;19:587-597.
34. Head GA. Baroreflexes and cardiovascular regulation in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26:S7-S16.
35. Lohmeier TE, Dwyer TM, Irwin ED *et al.* Prolonged activation of the baroreflex abolishes obesity-induced hypertension. *Hypertension* 2007;49:1307-1314.

**FIGURE LEGENDS**

**Fig. 1.** Mean  $\pm$  SD values of vagal gain **(A)** and sympathetic gain **(B)** in CTRL (control) and SD (sleep deprivation) rats at 3 months-old. \*Different from control group; #different from respective lean group.

**Fig. 2.** Mean  $\pm$  SD values of vagal gain **(A)** and sympathetic gain **(B)** in CTRL (control) and SD (sleep deprivation) rats at 6 months-old. \*Different from control group; #different from respective lean group.

**Fig. 3.** Mean  $\pm$  SD values of vagal gain **(A)** and sympathetic gain **(B)** in CTRL (control) and SD (sleep deprivation) rats at 15 months-old. \*Different from control group; #different from respective lean group.

**Table 1.** Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in control (CTRL) and sleep deprived (SD) lean and obese Zucker rats at 3, 6 and 15 months of age.

<b>Groups</b>	<b>Age (months)</b>	<b>Condition</b>	<b>MAP (mmHg)</b>	<b>HR (bpm)</b>	
<b>LEAN</b>	<b>3</b>	CTRL	101.1±9.8	420.4±30.2	
		SD	111.7±6.5*	411.9±40.6	
	<b>6</b>	CTRL	103.9±5.4	418.0±17.7	
		SD	105.8±6.3	375.8±14.6*	
	<b>15</b>	CTRL	100.0±11.7	400.3±7.2	
		SD	111.7±6.5*	411.9±40.6	
	<b>OBESE</b>	<b>3</b>	CTRL	112.8±4.8#	417.8±22.2
			SD	113.9±4.9	422.9±24.6
<b>6</b>		CTRL	116.0±6.8#	412.1±28.7	
		SD	110.1±1.5*	413.7±19.4#	
<b>15</b>		CTRL	101.3±10.8	361.6±49.3#	
		SD	113.9±4.9*	422.9±24.6*	

Shown are the means ± SD (n=8/9 rats/group). \* Different from age-matched CTRL; # Different from age-matched lean.  $P \leq 0.05$  (ANOVA two-way, Duncan test).

FIGURE 1

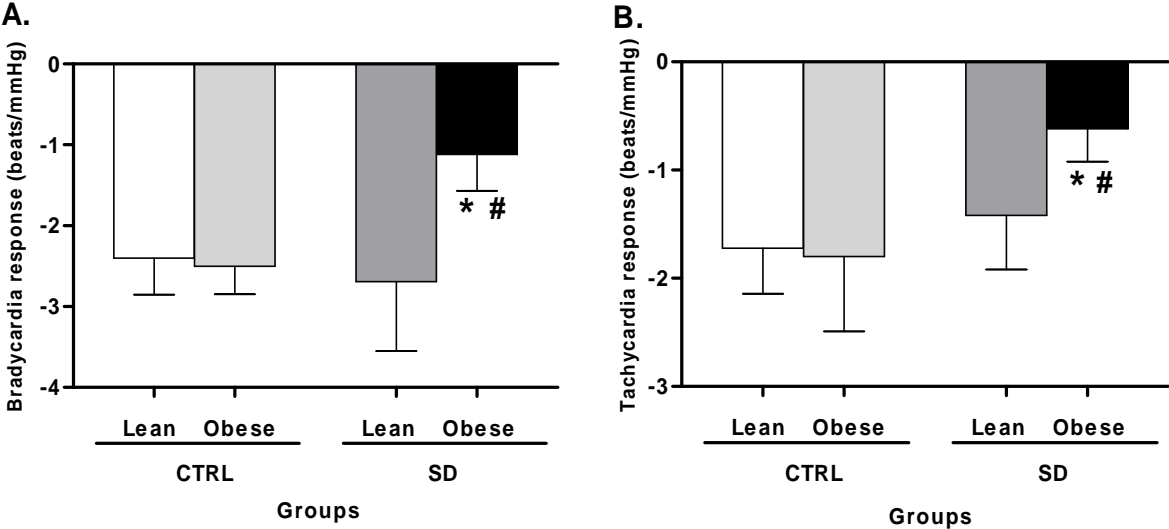


FIGURE 2

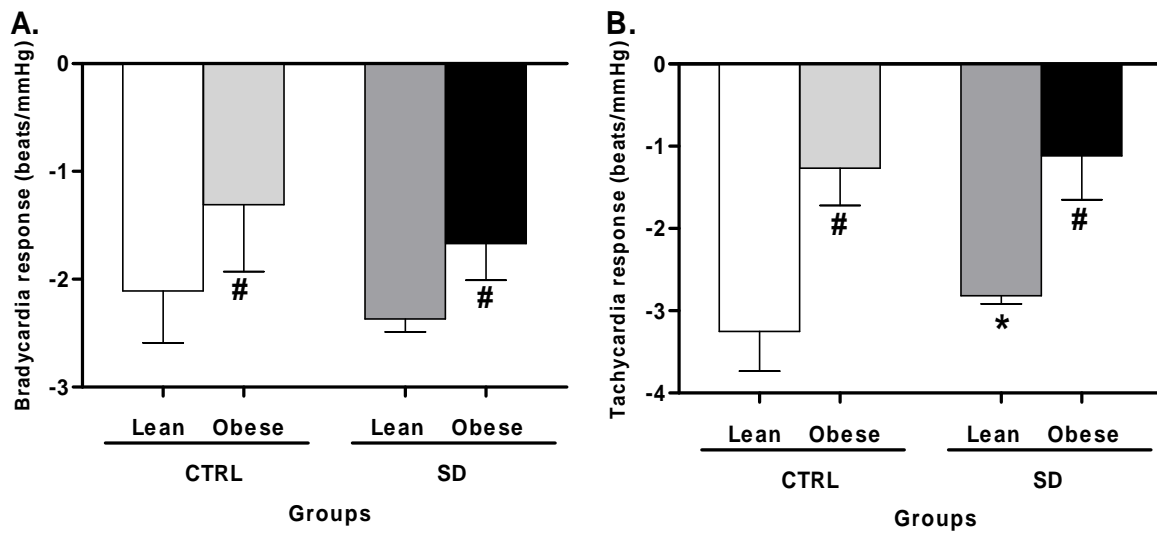
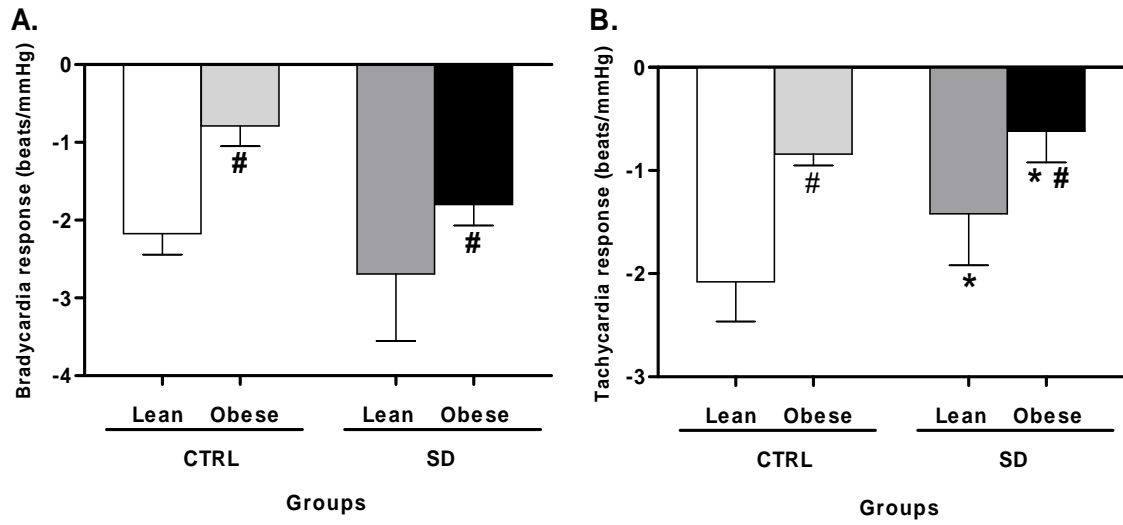




FIGURE 3



*Artigo II*  
*(Submetido: Journal of*  
*Experimental Biology)*

## RESUMO

### ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E HORMONAIS APÓS PRIVAÇÃO DE SONO EM RATOS

A redução do sono caracteriza a civilização moderna. Considerando o limitado conhecimento sobre o impacto da perda do sono e as diferenças sexuais no sistema cardiovascular, o objetivo desse estudo foi examinar a influência da privação de sono paradoxal (PSP) e da restrição de sono (RS) crônica sobre os parâmetros cardiovasculares e hormonais entre machos e fêmeas. Ratos adultos machos e fêmeas foram distribuídos nos seguintes grupos: controle (CTRL-gaiolas moradia), PSP (ratos submetidos ao PSP por 96 horas) ou RS (ratos submetidos à RS por 21 dias). Depois de cada protocolo, o índice de sensibilidade do barorreflexo foi medido por meio de infusões de fenilefrina (resposta bradicárdica) e nitroprussiato de sódio (resposta taquicárdica). Outro grupo de animais foi utilizado para coleta de sangue a fim de avaliar as concentrações de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Os resultados mostraram que a pressão arterial média foi significativamente maior no grupo RS comparado ao grupo CTRL em ambos os sexos. Nas ratas, a frequência cardíaca foi significativamente maior após a PSP em relação ao respectivo grupo CTRL. O protocolo de RS atenuou a resposta bradicárdica barorreflexa semelhantemente em ratos machos e fêmeas. A resposta taquicárdica barorreflexa foi reduzida no grupo de machos RS e PSP, no entanto, nesse parâmetro, as fêmeas foram afetadas somente após o procedimento PSP. Apenas a PSP aumentou significativamente as

concentrações de ACTH em relação ao grupo CTRL em ambos os sexos. Em relação ao sexo, não foram observadas diferenças para nenhum dos parâmetros cardiovasculares. Estes resultados sugerem que diferentes durações da perda de sono levou à conseqüências específicas sobre parâmetros cardiovasculares e hormonais e estes efeitos foram semelhantes em ratos fêmeas e machos.

## **Cardiovascular and hormonal alterations after sleep loss in rats**

Neuli M. Tenório<sup>1</sup>, Sergio Tufik<sup>1</sup>, Cássia T. Bergamaschi<sup>2</sup>, Ruy R. Campos<sup>2</sup>,  
Fátima Cintra<sup>1</sup>, Monica L. Andersen<sup>1</sup>

Departamento de Psicobiologia<sup>1</sup> e Fisiologia<sup>2</sup> - Universidade Federal de São Paulo,  
Brasil

**Running title:** Sleep loss and cardiovascular alterations

**Corresponding author:**

Monica L. Andersen

Department of Psychobiology - Universidade Federal de São Paulo

Rua Napoleão de Barros, 925

Vila Clementino - SP- 04024-002

São Paulo - Brazil

Phone # (55-11) 2149-0155

Fax # (55-11) 5572-5092

e-mail address: mandersen@psicobio.epm.br

### **Abstract**

Sleep curtailment characterizes the modern civilization. Considering the limited information known of the impact of sleep loss and sex differences on cardiovascular system, this study was designed to examine the influence of the paradoxical sleep deprivation (PSD) and chronic sleep restriction (SR) on cardiovascular and hormonal parameters across gender. Adult male and female rats were assigned into the following groups: control (CTRL-home-cages), PSD (rats subjected to PSD for 96 h) or SR (rats subjected to SR for 21 days). After each protocol, baroreflex sensitivity index was measured by bolus infusions of phenylephrine (bradycardia response) and sodium nitroprusside (tachycardia response). Another set of animals was used for blood collection to evaluate the concentrations of adrenocorticotrophic hormone (ACTH). The results showed that the mean arterial pressure was significantly higher in SR group compared to CTRL group in both sexes. In females, heart rate was significantly higher after PSD compared to respective CTRL group. The SR protocol attenuated the vagal baroreflex response similarly in male and female rats. The sympathetic baroreflex response was blunted in male SR and PSD groups, however, in the females this parameter was affected only after PSD procedure. Only PSD increased significantly ACTH concentrations compared to the CTRL group in both sexes. No sex-differences were observed for any of the cardiovascular parameters. These results suggest that different sleep loss durations led to specific consequences on cardiovascular and hormonal parameters and these effects were similar in male and in female rats.

**Key words:** Sleep loss, sex-differences, cardiac baroreflex, ACTH, rats.

## Introduction

It is well known that an adequate night of sleep is associated with good health. Changes in sleep duration or continuity have been associated with negative impacts on health outcomes (Patel *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2011). At the same time, it is well established that sex hormones influence sleep and circadian rhythms. However, little attention has been given to whether sleep is differentially regulated between sexes and the magnitude of the consequences of sleep loss. The well documented constellation of consequences of sleep restriction reported for males remains to be demonstrated in females. In fact, studies have found that healthy women appear to objectively have better sleep quality than men; however women of all adult age groups report more sleep problems, including inadequate sleep time and insomnia (Armitage *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2008; Gras *et al.*, 2009). In addition, nightmares were reported to be twice as frequent in women (Ohayon *et al.*, 1997).

Sleep is an important modulator of cardiovascular function, both in physiological and disease conditions. In particular, various studies have shown that sleep deprivation (SD) compromise cardiovascular regulation increasing the risk of cardiovascular diseases (Shamsuzzaman *et al.*, 2003; Meier-Ewert *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2010). In men, cardiovascular disease has been leading to cause of death mainly since men have been exposed to several stressors agents during the life (Hayes, 2006). Furthermore, it is well established that women tend to develop heart disease later in life than men. Thus, likewise the stress hormone, cardiovascular alterations may be particularly susceptible to the impact of sexual hormones (Francomano *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). Sleep deprivation is a stressor event as it elevated plasma levels of stress hormones such as adrenaline and glucocorticoids (Andersen *et al.*, 2004a; Andersen *et al.*, 2005). It has been proposed that chronic exposure to stress may alter the autonomic nervous system and neuroendocrine related to stress (Chandola *et al.*, 2006). Moreover, previous data have demonstrated that baroreflex sensitivity is attenuated whenever sympathetic nervous system activity is enhanced (La Rovere *et al.*, 1988; Tank *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2010). Of note, baroreflex sensitivity represents an index of arterial baroreflex function. Reduction in baroreflex sensitivity has been associated with

impaired regulation of blood pressure, electrical instability of the myocardium, hypertension and increased risk of cardiovascular disease-related mortality (Shamsuzzaman *et al.*, 2003; Timmers *et al.*, 2003; Dangardt *et al.*, 2011).

In the recent years, increasing attention has been given to cardiovascular alteration caused by acute or chronic sleep loss. However, to our knowledge, no prior study has examined whether different SD protocols evoke specific cardiovascular response in male and in female rats. The author hypothesized that sexual hormones could influence the impact of SD on baroreflex sensitivity, therefore the purpose of this study was to investigate the consequences of acute and chronic SD on baroreflex sensitivity in male and female rats.



## **Material and Methods**

### **Animals**

Experiments were performed on 60 male and 60 female Wistar rats, aged 3 months, provided by the Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) at Universidade Federal de São Paulo. Throughout the study, the experimental room was kept at controlled temperature ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ) and a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 07:00 h). Food and water were provided *ad libitum*. Rats used in this study were maintained and treated in accordance with the guidelines established by the Ethical and Practical Principles of the Use of Laboratory Animals (Andersen *et al.*, 2004b). All animal procedures were approved by the University's Ethics Committee (Protocol #1268/08).

### **Vaginal cytology**

Vaginal smears were conducted in order to determine the phase of the estrous cycle, and all samples were taken between 08:00 and 09:00 h. All animals were smeared daily including paradoxical sleep deprived (PSD) or sleep restricted (SR) period. Changes in vaginal epithelial cell morphology were used to indicate the phase of the estrous cycle (proestrus, estrus or diestrus). The rats that had 2 regular cycles were selected. All rats started the experiments in the diestrus phase of the estrous cycle. We elected to use rats only at diestrus since this phase was particularly affected by PSD 96 h in our previous study (Antunes *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2008).

### **Paradoxical sleep deprivation**

The rats were submitted to PSD over a period of 96 h by being placed on circular platforms (6 cm in diameter) 1 cm above water level in a cage (23x23x29 cm). Muscular atonia caused them to fall off the platform and awaken. After 96 h of sleep deprivation, the single platform procedure is effective in producing total suppression of paradoxical sleep. It therefore seems appropriate to refer to these animals as being paradoxical sleep deprived, rather than exclusively sleep-deprived. Throughout the study, the

experimental room was kept at controlled temperature ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) and a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 07:00 h). Food and water were provided *ad libitum* and the water in the tank was changed daily. The CTRL groups were housed in similar cages containing bedding in the same room as the experimental rats. The period of 96 h of PSD was chosen since our previous data demonstrated that at this time point, the most dramatic alterations in behaviors (Andersen *et al.*, 2003) and hormone concentration (Andersen *et al.*, 2005) are verified. The rats were weight immediately before and after PSD 96 h procedure or respective period in home-cages for CTRL group.

### **Sleep restriction**

The protocol consisted of submitting the rats to the sleep deprivation, as previously mentioned technique for 18 h (beginning at 16:00 h) for 21 days (SR period). After each 18 h of sleep deprivation period, rats were allowed to sleep for 6 h (sleep window). This time interval (10:00 h-16:00 h) was chosen because this is when paradoxical sleep attains its highest expression and slow wave sleep homeostatic pressure is already yielded. Another set of CTRL rats were used evaluate the effect of SR over cardiovascular responses. These animals were weight prior and after the end of SR protocols (21 days).

### **Experimental design to cardiovascular parameters**

Male and female rats were randomly assigned into a CTRL, PSD and SR groups (n=10/group). After the PSD, SR or equivalent period in CTRL group, male and female animals were submitted to surgical procedures. The rats were initially anesthetized by halothane inhalation (5%) and were maintained in a mix of 3% halothane with 100% O<sub>2</sub>. Tapered polyethylene catheters (PE-50) were placed in the right femoral artery to monitor arterial pressure and in the right femoral veins to infuse drugs. When the animals returned to their normal physiological functions (approximately 30 min), baseline values of mean arterial pressure and heart rate were measured for 5 min in conscious

and freely moving rats. Then, each animal received 3 bolus injections intravenous (0.1 ml) of phenylephrine (30, 50 and 100 µg/ml) and 3 bolus of sodium nitroprusside (50, 150 and 200 µg/ml) in random order and interval of 5 min.

The changes between baseline and peak values of the mean arterial pressure and the changes in heart rate reflex in response to pressor (phenylephrine) and depressor (sodium nitroprusside) injections were used to quantify baroreflex sensitivity (beat/mmHg) through the  $\Delta\text{HR}/\Delta\text{MAP}$  relationship for each animal.

### **Blood sampling and hormone of animal's determination**

Another group of animals was used in order to determine the ACTH concentration. Thus, after the PSD, SR or equivalent period in CTRL group, the animals were brought to an adjacent room and decapitated between 09:00 and 11:00 h. Some rats from CTRL group were decapitated each day along with those of PSD and SR groups. Blood was collected in glass tube and centrifuged to obtain samples of serum or plasma. The samples were maintained at -20 °C until the assays. ACTH concentrations (6.8%) were determined by a sequential chemiluminescence immunometric method using a monoclonal murine antibody specific for ACTH (DPC Immulite, Los Angeles, CA, USA). The sensitivity of the assay is 5 pg/ml.

### **Statistical Analysis**

Homogeneity or normality of variance tests were used in all analyses was assessed by the Levene and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. When these tests showed absence of homogeneity or normality, data were Z-score transformed. Two-way analysis of variance (ANOVA) test were conducted to determine differences associated with groups and sex and the interaction between these two factors. The Duncan *post hoc* test was used to analyze the difference between the groups on ACTH, mean arterial pressure, heart rate, bradycardia response and tachycardia response.

To each sex independently, ANOVA for repeated samples and *post hoc* Duncan

test was used to show the differences between the weight (before and after respective period) in CTRL (home-cage), PSD or SR groups. The statistical significance criterion was  $P \leq 0.05$ . Data are presented in the figures and text as means  $\pm$  SD.

## Results

### Body Weight

#### Male rats

As males usually presented increased weight compared to females, we elected to depict the data separately by gender. ANOVA test revealed a significant effect among the groups. Post-hoc testing indicated significant difference before and after experimental SD periods in groups. PSD group lost 9% of the body weight in relation to baseline measure ( $318.5 \pm 68.2$ g vs  $350.9 \pm 74.1$ g, respectively;  $P < 0.0001$ ), while CTRL and SR groups gained weight compared to baseline measure (CTRL:  $318.4 \pm 55.6$ g vs  $345.8 \pm 55.3$ g and SR:  $321.3 \pm 73.0$ g vs  $339.8 \pm 45.6$ g, respectively;  $P < 0.01$ ).

#### Female rats

ANOVA test revealed a significant effect among the groups. Post-hoc testing indicated significant difference before and after experimental SD periods in groups. PSD group lost 5% of their body weight in relation to baseline measure ( $230.8 \pm 24.8$ g vs  $241.3 \pm 26.1$ g, respectively;  $P < 0.001$ ). CTRL and SR groups gained weight compared to baseline measure (CTRL:  $238.6 \pm 20.1$ g vs  $228.3 \pm 21.8$ g, and SR:  $220.2 \pm 13.7$ g vs  $214.4 \pm 15.5$ g, respectively;  $P < 0.001$  and  $P < 0.03$ ).

#### ACTH analysis

ANOVA two-way test showed a significant effect for the two factors: sex and groups. PSD male rats exhibited significantly higher concentrations of ACTH compared to respective CTRL ( $104.8 \pm 41.9$ pg.mL<sup>-1</sup> vs  $41.7 \pm 41.1$ pg.mL<sup>-1</sup>, respectively;  $P < 0.01$ ) and to SR group ( $104.8 \pm 41.9$ pg.mL<sup>-1</sup> vs  $49.8 \pm 19.5$ pg.mL<sup>-1</sup>, respectively;  $P < 0.01$ ). SR male and female groups did not show statistical difference compare to respective CTRL group, as depicted in Fig. 1. PSD males showed significantly higher concentrations

compared to PSD females ( $41.9 \pm 15.8 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  vs  $23.8 \pm 6.9 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively;  $P < 0.001$ ). However, no significant differences were found between SR females and SR males for this parameter.

### **Cardiovascular analysis**

In relation to cardiovascular parameters, ANOVA two-way test showed significant differences for the group factor.

*Mean arterial pressure.* PSD protocol did not evoke any significant effects for this parameter. SR male group presented significantly higher values compared to CTRL males ( $116.6 \pm 14.9 \text{ mmHg}$  vs  $105.3 \pm 9.1 \text{ mmHg}$ , respectively;  $P < 0.05$ ). Similarly, arterial pressure in SR female group was significantly higher compared to CTRL females ( $117.5 \pm 10.3 \text{ mmHg}$  vs  $107.2 \pm 7.0 \text{ mmHg}$ , respectively;  $P < 0.05$ ) as shown in Fig. 2. There were no significant differences between PSD and SR for both genders.

*Heart rate.* PSD female group (but not in males) showed significantly higher values compared to respective CTRL group ( $431.13 \pm 42.9 \text{ bpm}$  vs  $382.0 \pm 41.8 \text{ bpm}$ , respectively;  $P < 0.01$ ). The 21 day protocol of SR resulted in significant higher rates in PSD male group compared SR male group ( $451.9 \pm 33.7 \text{ bpm}$  vs  $368.6 \pm 59.9 \text{ bpm}$  respectively;  $P < 0.001$ ) as well as in PSD female group compared to SR female group ( $431.1 \pm 42.9 \text{ bpm}$  vs  $358.4 \pm 22.1 \text{ bpm}$ , respectively;  $P < 0.01$ ) as shown in Fig. 3. No significant differences were found for PSD and SR between the genders.

*Bradycardia response of cardiac baroreflex.* PSD did not exert any statistical difference in relation to CTRL rats in both sexes. SR male group presented significantly lower values compared to CTRL male group ( $-1.9 \pm 0.7 \text{ beat/mmHg}$  vs  $-2.7 \pm 0.7 \text{ beat/mmHg}$ , respectively;  $P < 0.05$ ) and to PSD male group ( $-1.9 \pm 0.7 \text{ beat/mmHg}$  vs  $-2.8 \pm 0.7 \text{ beat/mmHg}$ , respectively;  $P < 0.01$ ). In SR female group, the bradycardia response was significantly lower compared to respective CTRL gender group ( $-1.8 \pm 0.5 \text{ beat/mmHg}$  vs  $-2.4 \pm 0.4 \text{ beat/mmHg}$ , respectively;  $P < 0.01$ ) and trend to lower response than PSD female group ( $-1.8 \pm 0.5 \text{ beat/mmHg}$  vs  $-2.4 \pm 0.5 \text{ beat/mmHg}$ , respectively;  $P = 0.06$ ) as depicted in Fig. 4. No significant differences were observed for PSD or SR between the genders.

*Tachycardia response of cardiac baroreflex.* Both PSD ( $-1.3 \pm 0.4$  beat/mmHg) and SR male groups ( $-1.7 \pm 0.8$  beat/mmHg) showed significantly lower tachycardia response compared to CTRL male group ( $-2.5 \pm 0.9$  beat/mmHg, respectively;  $P < 0.0001$  and  $P < 0.01$ ). PSD female group showed significantly lower values compared to CTRL female group ( $-1.52 \pm 0.4$  beat/mmHg vs  $-2.0 \pm 0.2$  beat/mmHg, respectively;  $P < 0.02$ ), as illustrate in Fig. 5. CTRL female rats showed significantly lower tachycardia response in relation to CTRL males ( $-2.0 \pm 0.2$  beat/mmHg vs  $-2.5 \pm 0.7$  beat/mmHg, respectively;  $P < 0.03$ ). No significant differences were observed for PSD or SR between the sexes.

## Discussion

The sleep deprivation and restriction protocols adopted in this present study were able to produce marked alterations in cardiovascular system in male and female rats. The SR evoked the major alterations at mean arterial pressure and bradycardia response in both sexes whereas tachycardia response was only decreased in male rats. Heart rate, in turn, was affected only in female rats after PSD. As expected, the stress-prominent PSD protocol altered the ACTH concentrations and the tachycardia response of baroreflex cardiac in both sexes. No significant sex-differences changes were observed for cardiovascular variables.

The short-term PSD and chronic SR resulted in similar changes in body weight to male and to female rats when the experimental period was compared to respective baseline weight. As described in previous studies, PSD for 96 h evoked body weight loss in male rats (Martins *et al.*, 2006). In the present study, we expanded these results by showing that female rats also presented the same pattern of weight loss, regardless the duration of the procedure. In fact, a general feature of the rat SD literature is that when it is applied over many days, it lead to body weight loss (Martins *et al.*, 2006; Koban *et al.*, 2008).

In relation to stress hormone, consistently with the previous findings from our group, circulating ACTH was significantly increased in PSD rats after 96 h (Andersen *et al.*, 2004b; Andersen *et al.*, 2005; Zager *et al.*, 2007). Some could argue the stress involved in this platform technique could lead to this effect. Indeed, sleep loss involves in an inherent degree of stress and promote several alterations in humans (Spiegel *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2010) and in rodents (De Paula *et al.*, 2004; Fukushiro *et al.*, 2007). Of note, when the sleep loss was prolonged for three weeks, there were not significant changes in the concentrations of ACTH in male rats neither in female rats compared to respective CTRL groups. Similar results for male SR rats were found in previous studies (Meerlo *et al.*, 2002; Zager *et al.*, 2007). It is widely accepted that different stress intensities lead to distinct physical, physiological and psychological responses (Pack *et al.*, 1998; Filaire *et al.*, 2004; Papale *et al.*, 2005) and probably gender also cause distinct responses. Male and female PSD rats showed significant increased levels

compared to the respective CTRL groups, the magnitude of response was most pronounced in female than in male rats (178% and 151%, respectively). In humans, men typically respond to stress with greater increases in plasma levels of catecholamines than women (Mills *et al.*, 1996; Schenck-Gustafsson *et al.*, 1996).

In respect to the cardiovascular responses, we did not detect sex-differences. However, different SD methods evoked specific consequences on each gender. For example, tachycardia responses to arterial pressure changes was significantly decreased in male PSD and SR groups compared to respective CTRL group. In female rats, only PSD affected this parameter. The bradycardia response was not significantly altered by PSD and SR male and female groups exhibited similar attenuated baroreflex function compared to respective CTRL and PSD groups. According to previous studies, chronic SD is associated with cardiovascular events through autonomic activity as determined by heart rate variability (Ogawa *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2005; Gangwisch *et al.*, 2006). Some parameters that influence baroreflex sensitivity are the autonomic nervous system balance and arterial distensibility (Tank *et al.*, 2004; Monahan *et al.*, 2001). In addition, baroreflex sensitivity seems to be blunted when central arterial compliance is reduced (Bonyhay *et al.*, 1996; Monahan *et al.*, 2001).

Several studies have documented the relationship between impaired function of cardiac baroreflex and enhanced arterial pressure (Grassi *et al.*, 2003; Celovská *et al.*, 2010; Kuzmenko *et al.*, 2009). These evidences are in accordance with the current study, since male and female rats showed increased mean arterial pressure and decreased bradycardia response after being sleep restricted for 21 days. Similarly, Tank and colleagues (2005) reported the slope of the baroreflex curves was virtually identical in men and women. Moreover, indices of sympathetic nervous system activity suggest that normal resting function was similar in men and women (Hinojosa-Laborde *et al.*, 1998). These studies do not sustain the hypothesis that females have a greater ability to attenuate sympathetic nerve activation or augment sympathetic nerve inhibition in the heart.

According to the present results, although SR increased mean arterial pressure, PSD was not considered a risk factor for hypertension as arterial pressure was not



higher compared to CTRL male and female groups. In contrast, the heart rate was significantly augmented only in PSD female group compared to respective sex-CTRL group. Nevertheless, SR did not induce any significant changes in heart rate compared to respective sex-CTRL group. These data indicate that cardiovascular mechanisms controlling blood pressure and heart rate can occur dependently of sleep loss protocols but independently of the gender.

It is widely accepted that females are protected against the development of cardiovascular risk (Hinojosa-Laborde *et al.*, 1998) since female hormones are known to be involved in various physiological responses, including the estrogen cardio protection (Colditz *et al.*, 1987; Stampfer *et al.*, 1991; Barret-Connor & Grady, 1991; Hachul *et al.*, 2008). Nevertheless, the sleep curtailment observed in the recent decades caused by several factors including social life, artificial light, shift-work and sleep disturbances can increase the morbidity and mortality of several diseases, including cardiovascular injuries also in women (Krishnan & Collop, 2006). There are many cases in which women play the dual roles of the mother/housewife and professional working during periods when she should be resting. This state of affairs renders also women in a constant state of stress/sleep restriction and consequence on sleep-wake cycle. In spite of this scenario, our study demonstrated that sleep loss affected similarly male and female adult rats. In fact, the current data corroborate with previous investigations indicating that female rats were affected as much as males by sleep loss protocols, indicating that the sex-hormones did not exert protective role against cardiovascular alterations in this context. Finally, our findings suggest distinct role of both short and long duration of sleep in the etiology of cardiovascular responses and stress hormone concentration and further that the overall biological effects being similar in male and in female rats.

### **Funding**

This work was supported by grants from Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (CEPID #98/14303-3). ST, MLA, CTB and RRC are recipients of CNPq fellowships.

### **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the invaluable assistance of Marilde Costa and Waldemarks Leite.

**Conflict of Interest:** none declared.

## References

1. Andersen ML, Bignotto M & Tufik S (2003). Cocaine-induced genital reflexes during paradoxical sleep deprivation and recovery. *Physiol Behav* **78**, 255-259.
2. Andersen ML, Papale LA & Tufik S (2004a). Diurnal variation in the genital reflexes and hormonal levels induced by paradoxical sleep deprivation and cocaine in male rats. *Brain Res Bull* **64**, 215-220.
3. Andersen ML, Bibnotto M, Machado RB & Tufik S (2004b). Different stress modalities result in distinct steroid responses by male rats. *Braz J Med Bil Res* **37**, 791-797.
4. Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M & Tufik S (2005). Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res* **14**, 83-90.
5. Anderson C & Platten CR (2011). Sleep deprivation lowers inhibition and enhances impulsivity to negative stimuli. *Behavioural Brain Research* **217**, 463–466.
6. Andersen ML, Antunes IB, Silva A, Alvarenga TAF, Baracat EC & Tufik S (2008). Effects of sleep loss on sleep architecture in Wistar rats Gender-specific rebound sleep. *Progress in Neuro-Psycho & Biol Psychiatry* **32**, 975-983.
7. Antunes IB, Andersen ML, Baracat EC & Tufik S (2006). The effects of paradoxal sleep deprivation on estrous cycles of the female rats. *Horm Behav* **49**, 433-440.
8. Armitage R, Yonkers K, Cole D & Rush AJ (1997). A multicenter, double-blind comparison of the effects of nefazodone and fluoxetine on sleep architecture and quality of sleep in depressed outpatients. *J Clin Psychopharmacol* **17**, 161-168.
9. Barret-Connor E & Grady D (1998). Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health* **19**, 55–72.
10. Bonyhay I, Jokkel G & Kollai M (1996). Relation between baroreflex sensitivity and carotid artery elasticity in healthy humans. *Am J Physiol* **271**, H1139–H1144.
11. Celovská D, Stasko J, Gonsorcík J & Dukát A (2010). The value of baroreflex sensitivity for cardiovascular risk stratification in hypertensives. *Vnitr Lek* **56**, 607-612.

12. Chandola T, Brunner E & Marmot M (2006). Chronic stress at work and the metabolic syndrome: prospective study. *Br Med J* **332**, 521–525.
13. Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE & Hennekens CH (1987). Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* **316**, 1105–1110.
14. Dangardt F, Volkmann R, Chen Y, Osika W, Marild S & Friberg P (2011). Reduced cardiac vagal activity in obese children and adolescents. *Clin Physiol Funct Imaging* **31**, 108-113.
15. De Paula HM & Hoshino K (2004). Potentiation of panic-like behaviours of the rat by subconvulsive doses of strychnine. *Physiol Behav* **80**, 459-464.
16. Filaire E, Bonis J & Lac G (2004). Relationships between physiological and psychological stress and salivary immunoglobulin among young female gymnasts. *Percept Mot Skills* **99**, 605-617.
17. Francomano D, Bruzziches R, Natali M, Aversa A & Spera G (2010). Cardiovascular effect of testosterone replacement therapy in aging male. *Acta Biomed* **81**, 101-106.
18. Fukushiro DF, Calzavara MB, Trombin TF, Lopez GB, Abílio VC, Andersen ML *et al* (2007). Effects of environmental enrichment and paradoxical sleep deprivation on open-field behavior of amphetamine-treated mice. *Physiol Behav* **92**, 773-779.
19. Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, Buijjs RM, Kreier F, Pickering TG *et al* (2006). Short sleep duration as a risk factor for hypertension: analyses of the first National Healthy and Nutrition Examination Survey. *Hypertension* **47**, 833-839.
20. Gras CB, Hidalgo JL, Garcia YD, Lapeira JY, Ferrer AV & Martinez IP (2009). Sleep disorders and environmental conditions in the elderly. *Aten Primaria* **41**, 564-569.
21. Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F, Dell'Oro R, Bolla G & Mancia G (2003). Effects of hypertension and obesity on the sympathetic activation of heart failure patients. *Hypertension* **42**, 873–877.

22. Hachul H, Bittencourt LR, Andersen ML, Haidar MA, Baracat EC & Tufik S (2008). Effects of hormone therapy with estrogen and/or progesterone on sleep pattern in postmenopausal women. *Int J Gynaecol Obstet* **103**, 207-212.
23. Hayes SN (2006). Preventing cardiovascular disease in women. *Am Fam Physician* **74**, 1331–1340.
24. Hinojosa-Laborde C, Chapa I, Lange D & Haywood JR (1998). Gender differences in sympathetic nervous system regulation. *Clinical and Experimental Pharmacol and Physiol* **26**, 122-126.
25. Kim JC, Joo KJ, Kim JT, Choi JB, Cho DS & Won YY (2010). Alteration of autonomic function in female urinary incontinence. *Int Neurourol J* **14**, 232-237.
26. Koban M, Sita LV, Le WW & Hoffman GE (2008). Sleep deprivation of rats: the hyperphagic response is real. *Sleep* **31**, 927-933.
27. Krishnan V & Collop NA (2006). Gender differences in sleep disorders. *Curr Opin Pulm* **12**, 383-389.
28. Kuzmenko NV, Pliss MG & Tsyrlin VA (2009). Baroreceptor reflex and arterial hypertension. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* **95**, 1190-1197.
29. La Rovere MT, Specchia G, Mortara A & Schwartz PJ (1988). Baroreflex sensitivity, clinical correlates, and cardiovascular mortality among patients with a first myocardial infarction: a prospective study. *Circulation* **78**, 816–824.
30. Martins PJ, D'Almeida V, Nobrega JN & Tufik S (2006). A reassessment of the hyperphagia/weight-loss paradox during sleep deprivation. *Sleep* **29**, 1233-1238.
31. Martins RC, Andersen ML, Garbuio SA, Bittencourt LR, Guindalini C, Shih MC *et al* (2010). Dopamine transporter regulation during four nights of REM sleep deprivation followed by recovery--an in vivo molecular imaging study in humans. *Sleep* **33**, 243-251.
32. Meerlo P, Koehl M, van der Borght K & Turek FW (2002). Sleep restriction alters the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *J Neuroendocrinol* **14**, 397-402.

33. Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Regan MM, Price NJ, Dinges DF & Mullington JM (2004). Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* **43**, 678-683.
34. Mills PJ, Ziegler MG, Nelesen RA & Kennedy BP (1996). The effects of the menstrual cycle, race, and gender on adrenergic receptors and agonists. *Clin Pharmacol Ther* **60**, 99–104.
35. Monahan KD, Dinunno FA, Seals DR, Clevenger CM, Desouza CA & Tanaka H (2001). Age-associated changes in cardiovagal baroreflex sensitivity are related to central arterial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H284–H289.
36. Nagai M, Hoshida S & Kario K (2010). Sleep duration as a risk factor for cardiovascular disease- a review of the recent literature. *Curr Cardiol Rev* **6**, 54-61.
37. Ogawa Y, Kanbayashi T, Satio Y, Takahashi Y, Kitajima T, Takahashi K *et al* (2003). Total Sleep deprivation elevates blood pressure through arterial baroreflex resetting: a study with microneurographic technique. *Sleep* **26**, 934-936.
38. Ohayon MM, Morselli PL & Guilleminault C (1997). Prevalence of nightmares and their relationship to psychopathology and daytime functioning in insomnia subjects. *Sleep* **20**, 340-348.
39. Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ & Goldstein DS (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* **275**, R1247-R1255.
40. Papale LA, Andersen ML, Antunes IB, Alvarenga TA & Tufik S (2005). Sleep pattern in rats under different stress modalities. *Brain Res* **1060**, 47-54.
41. Patel SR, Malhotra A, White DP, Gottlieb DJ & Hu FB (2006). Association between reduced sleep and weight gain in women. *Am J Epidemiol* **164**, 947–954.
42. Schenck-Gustafsson K (1996). Risk factors for cardiovascular disease in women: Assessment and management. *Eur Heart J* **17**, 2-8.
43. Shamsuzzaman ASM, Caples SM & Somers VK (2003). Sleep deprivation and circulatory control. *Sleep* **26**, 934-936.

44. Silva A, Andersen ML, De Mello MT, Bittencourt LR, Peruzzo D & Tufik S (2008). Gender and age differences in polysomnography findings and sleep complaints of patients referred to a sleep laboratory. *Braz J Med Biol Res* **12**, 1067-1075.
45. Spiegel K, Leproult R & Cauter EV (1999). Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* **354**, 1435-1439.
46. Stampfer MJ, Colditz GA & Willett WC (1991). Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the Nurses' Health study. *N Engl J Med* **325**, 756–762.
47. Tank J, Jordan J, Diedrich A, Obst M, Plehm R, Luft FC & Gross V (2004). Clonidine improves spontaneous baroreflex sensitivity in conscious mice through parasympathetic activation. *Hypertension* **43**, 1042-1047.
48. Tank J, Diedrich A, Szezech E, Luft FC & Jordan J (2005). Baroreflex regulation of heart rate and sympathetic vasomotor tone in women and men. *Hypertension* **45**, 1159-1164.
49. Timmers HJ, Wieling W, Karemaker JM & Lenders JW (2003). Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. *J Physiol* **553**, 3-11.
50. Young CN, Deo SH, Chaudhary K, Thyfault JP & Fadel PJ (2010). Insulin enhances the gain of arterial baroreflex control of muscle sympathetic nerve activity in humans. *J Physiol* **588**, 3593-603.
51. Zager A, Andersen ML, Ruiz FS, Antunes IB & Tufik S (2007). Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* **293**, R504-R509.
52. Zhang B & Wing YK (2006). Sex differences in insomnia: a meta-analysis. *Sleep* **29**, 85-93.
53. Zhong X, Hilton HJ, Gates GJ, Jelic S, Stern Y, Bartels MN *et al* (2005). Increased sympathetic and decreased parasympathetic cardiovascular modulation in normal humans with acute sleep deprivation. *Journal of Applied Physiology* **98**, 2024-2032.

### Figure Legends

**Figure 1.** Mean  $\pm$  SD concentration of adrenocorticotropin (ACTH) [ $\text{pg mL}^{-1}$ ] in control (CTRL), paradoxical sleep deprived (PSD) and sleep restricted (SR) male and female rats.

**Figure 2.** Mean  $\pm$  SD values of mean arterial pressure [mmHg] in control (CTRL), paradoxical sleep deprived (PSD) and sleep restricted (SR) male and female rats.

**Figure 3.** Mean  $\pm$  SD values of heart rate [bpm] in control (CTRL), paradoxical sleep deprived (PSD) and sleep restricted (SR) male and female rats.

**Figure 4.** Mean  $\pm$  SD values of vagal gain [beat/mmHg] in control (CTRL), paradoxical sleep deprived (PSD) and sleep restricted (SR) male (A) and female (B) rats.

**Figure 5.** Mean  $\pm$  SD values of sympathetic gain [beat/mmHg] in control (CTRL), paradoxical sleep deprived (PSD) and sleep restricted (SR) male and female rats.



**Table 1.** Mean  $\pm$  SD values of body weight [grams] in control (CTRL), paradoxical sleep deprived (PSD) and sleep restricted (RS) male and female rats.

<b>Gender</b>	<b>Group</b>	<b>Baseline</b>	<b>Final</b>
<b>Male</b>	<b>CTRL</b>	318.0 $\pm$ 55.9	345.8 $\pm$ 55.3*
	<b>PSD</b>	350.9 $\pm$ 74.1	318.5 $\pm$ 68.2*
	<b>RS</b>	321.3 $\pm$ 73.0	339.8 $\pm$ 45.6*
<b>Female</b>	<b>CTRL</b>	228.3 $\pm$ 21.8	238.6 $\pm$ 20.5*
	<b>PSD</b>	241.3 $\pm$ 26.2	230.8 $\pm$ 24.8*
	<b>RS</b>	214.4 $\pm$ 15.5	220.2 $\pm$ 13.7*

\*Different from respective baseline body weight. See text for p values.

Figure 1

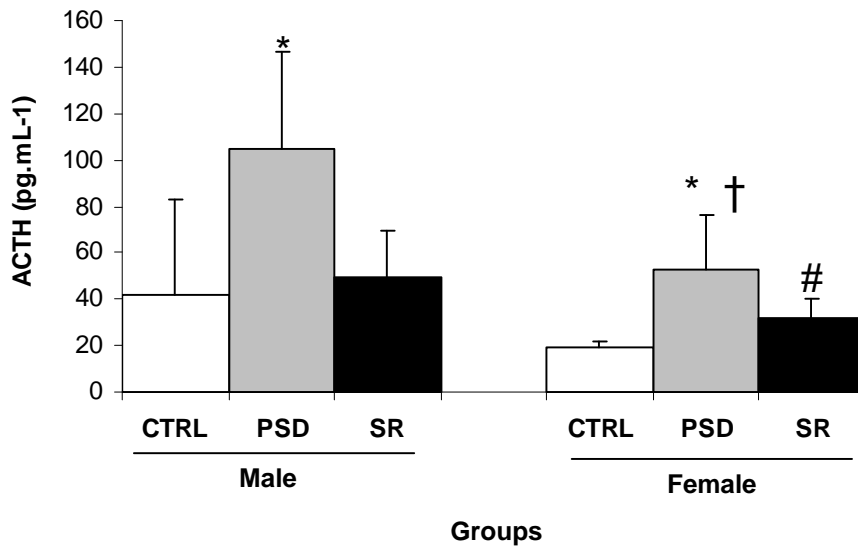


Figure 2

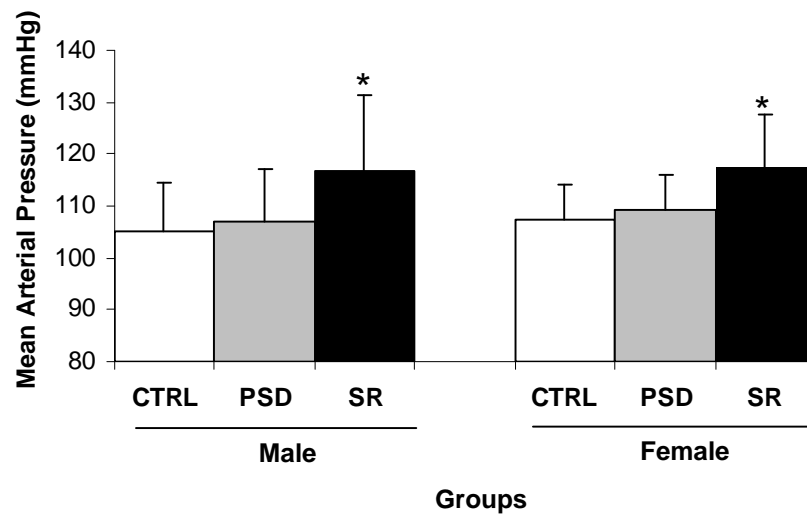


Figure 3

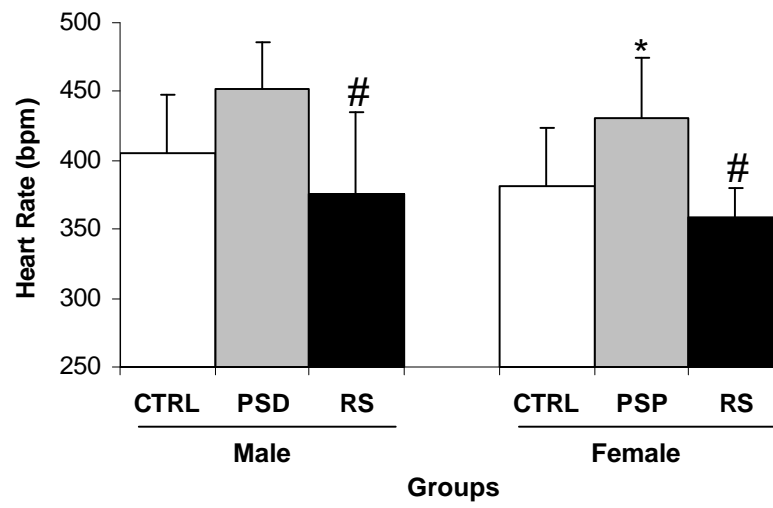


Figure 4

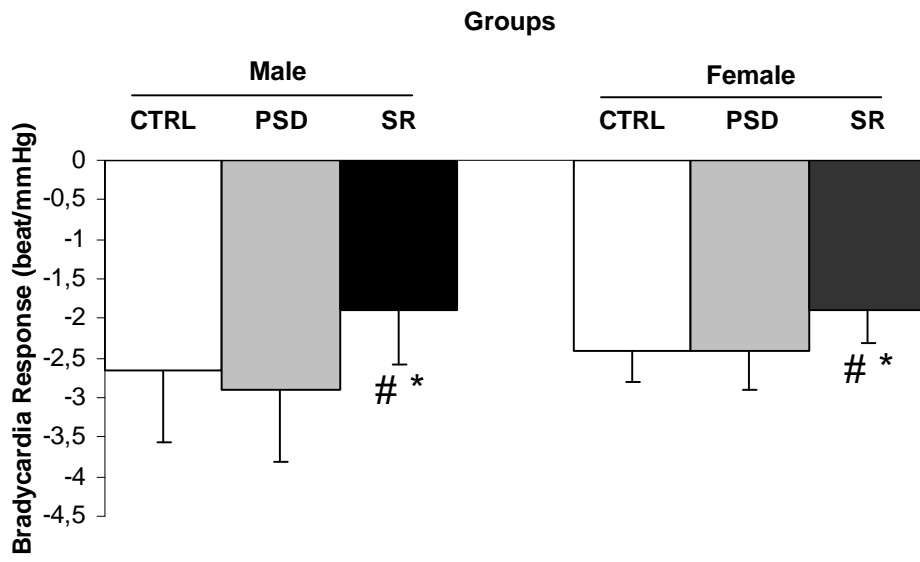
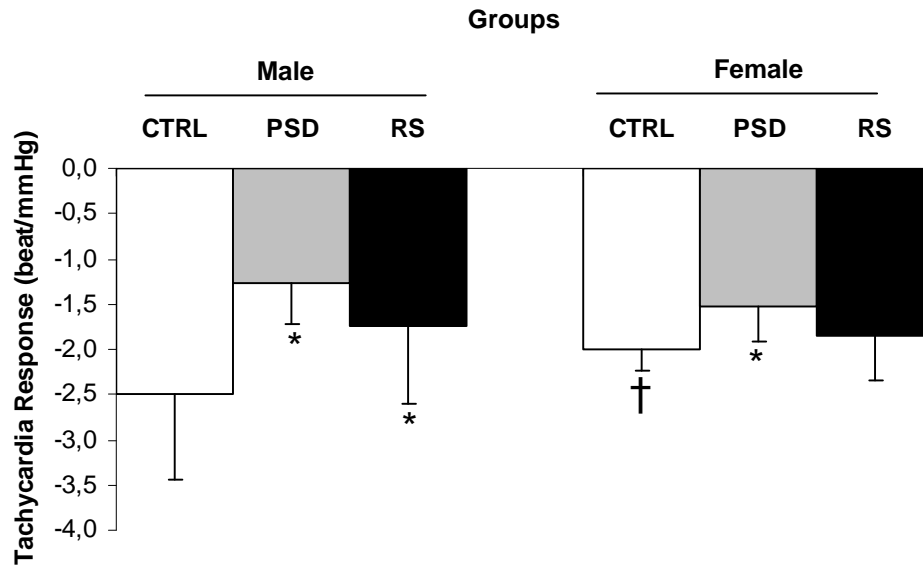


Figure 5



# *Discussão*

## 6.0 DISCUSSÃO

A obesidade associada a PS tem recebido atenção particular nas últimas décadas. Indivíduos obesos são geralmente vítimas de sono não-restaurador e sabe-se que indivíduos privados de sono podem aumentar o peso corporal significativamente. Além da obesidade e da PS, há ainda o processo de envelhecimento advindo do aumento da expectativa de vida tanto nos países desenvolvidos quanto nos subdesenvolvidos. Assim, há uma associação causal entre a PS e o ganho de peso corporal, que pode ser particularmente importante com o envelhecimento da população.

De acordo com os achados do presente estudo, a obesidade exerceu os maiores efeitos em relação ao desbalanço autonômico cardiovascular. As alterações nas respostas barorreflexas bradicárdica e taquicárdica ocorreram desde os 3 meses de idade em ratos obesos. Quando os fatores de risco já citados (obesidade, PS e idade) foram estudados isoladamente, a obesidade exerceu maiores efeitos nos parâmetros cardiovasculares comparado aos efeitos da PS aos 6 e aos 15 meses de idade. Além disso, a interação entre obesidade e PS causou danos mais significativos nos animais mais velhos. Em relação à pressão arterial média, os efeitos dos fatores de risco foram associados à condição idade. Assim, aos 3 e aos 6 meses de idade, a obesidade provocou elevação na pressão arterial média nos ratos CTRL. Aos 15 meses, a PS provocou aumento na pressão arterial média tanto em ratos magros como obesos.

Tem sido bem documentado que o aumento no peso corporal é associado com mudanças no controle autonômico do sistema cardiovascular (Hofmann et al., 2000). Indivíduos obesos sofrem de um alto risco de mortalidade supostamente



devido às complicações cardiovasculares relacionadas também a uma contínua baixa atividade parassimpática ou alterada atividade simpática (Hubert et al., 1983). Hirsch e colaboradores (1991) descreveram uma relação inversa entre a quantidade de ganho de peso e a redução no controle parassimpático. Embora os mecanismos envolvidos na redução da resposta barorreflexa cardíaca com a obesidade sejam desconhecidos, a leptina poderia estar relacionada a este efeito, uma vez que os ratos Zucker obesos têm altos níveis de leptina plasmática (Jin et al., 2003; Rivera et al., 2009).

A leptina é um hormônio secretado pelas células de gordura (Schwartz et al., 1996; Hall et al., 2001). Este hormônio atravessa a barreira hemato-encefálica e ativa os neurônios localizados em diversas áreas do hipotálamo, incluindo o núcleo paraventricular e contribui para a hiperfagia e o ganho de peso corporal (Van Dijk et al., 1996; Elmquist, 2001). Além de seu papel na manutenção do balanço energético, a leptina também participa na regulação central da função cardiovascular (Correia et al., 2001). A aplicação central de leptina aumenta a atividade simpática, resultando em um aumento na pressão arterial sistêmica (Correia et al., 2001) que parece ser mediada pela interação com o sistema barorreflexo arterial (Grassi, 2004). Um número crescente de estudos sugere que a leptina possa estar intrinsecamente envolvida nos mecanismos de programação do desenvolvimento de disfunção cardiovascular e metabólica. No entanto, alguns autores consideram que a falta de receptores de leptina funcional não pode ser a única causa para a função barorreflexa alterada em ratos Zucker obesos, uma vez que quando jovens esses animais apresentam atividade barorreflexa normal (Schreihöfer et al., 2007; Domitila et al., 2010). Sob outro ponto de vista, o estudo de Buñag e colaboradores (1990)

sugere que a alteração cardiovascular e do barorreflexo em ratos obesos pode resultar de um desequilíbrio autonômico envolvendo atividade parassimpática diminuída.

Estudos epidemiológicos recentes têm apontado para uma relação distinta entre a duração do sono e do peso corporal (Hasler et al., 2004; Taheri et al., 2004; Gangwish et al., 2005; Vorona et al., 2005). De fato, a regulação neuroendócrina de apetite e ingestão alimentar também parece ser influenciada pela duração do sono, e a RS pode favorecer o desenvolvimento da obesidade, uma vez que o sono exerce um importante papel no balanço energético (Copinschi et al., 2005). Além disso, é bem conhecido que a obesidade é caracterizada pela ativação do sistema nervoso simpático e há considerável evidência que essa ativação exerça um importante papel no desencadeamento e na manutenção da hipertensão (Esler et al., 2006). Por outro lado, Kurtz e colaboradores (1989) consideram que o aumento da pressão arterial é um fator independente do genótipo obeso. Em ratos Zucker obesos não-anestesiados, Bass e Ritter (1985) afirmaram que a pressão arterial média não foi significativamente aumentada em comparação com ratos Zucker magros.

Em nossos estudos, houve disfunção barorreflexa desde aos 3 meses de idade em ratos obesos e PS, este grupo também apresentou aumento significativo na pressão arterial média aos 15 meses de vida. No entanto, o grupo obeso-CTRL não mostrou aumento significativo na pressão arterial média aos 15 meses mesmo com uma disfunção barorreflexa evidente desde os 6 meses de vida. Em contraste, a PS em ratos de 15 meses aumentou significativamente a pressão arterial média em animais magros; contudo, a disfunção barorreflexa foi diminuída apenas quanto a

resposta taquicárdica. De acordo com esses achados, sugere-se que não há uma relação direta entre o desbalanço barorreflexo e o aumento da pressão arterial.

O reflexo barorreceptor é um importante sistema neural regulatório para manter a estabilidade cardiovascular (Tanaka et al., 2004). É por meio desse reflexo que o sistema nervoso central controla a pressão arterial em resposta aos desafios impostos por oscilações pressóricas.

As doenças cardiovasculares são freqüentemente acompanhadas de deficiência da resposta barorreflexa e essa disfunção pode não só contribuir para um maior dano de órgãos alvos e na progressão da doença subjacente, mas também ser capaz de predizer aumento do risco cardiovascular (La Rovere et al., 2001). Dessa forma, anormalidades dos reflexos barorreceptores contribuem de forma importante para alterações na atividade nervosa autonômica com subsequente implicações em uma variedade de distúrbios cardiovasculares, como por exemplo infarto agudo do miocárdio (La Rovere et al., 1998) ou disfunção ventricular esquerda (Osterziel et al., 1995). Por este motivo, a análise da resposta barorreflexa cardíaca por si só representa um fator prognóstico negativo em doenças cardiovasculares e um importante marcador de risco de mortalidade independente de mensurações hemodinâmicas (Mortara et al., 1997).

Vários estudos em humanos e animais têm demonstrado que o reflexo barorreceptor pode se adaptar em condições fisiológicas, tais como o exercício físico (Gallagher et al., 2006), o sono (Nagura et al., 2004), o estresse térmico (Crandall et al., 2003), gravidez (Crandall et al., 1990) e também em condições patológicas, o descondicionamento cardiovascular (Hasser e Moffitt, 2001) e a hipertensão arterial (Grassi et al., 1998; Head et al., 2001). De fato, cada vez mais pesquisas sugerem

que os barorreceptores desempenham um importante papel no controle a longo prazo da pressão arterial (Thrasher, 2004). Como resultado, cresce o interesse em terapias com anti-hipertensivos, com efeitos benéficos sobre a hipertensão relacionada com ativação simpática (Grassi, 2003). Lohmeier e colaboradores (2005) consideram que a ativação sustentada do barorreflexo desempenha um papel importante na atenuação da ativação simpática comumente relatados na hipertensão primária, logo, pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento a longo prazo da hipertensão arterial bem como na progressão da doença. Especificamente no sexo feminino, a estreita relação entre a sensibilidade do barorreflexo e da pressão arterial em mulheres hipertensas apenas sustenta a hipótese de que a disfunção autonômica pode desempenhar um papel mais importante na hipertensão do sexo feminino.

Embora para alguns estudiosos, a relação entre a disfunção barorreflexa esteja comprovada, para outros, o papel do barorreflexo no controle a longo prazo da pressão arterial não é clara. Por exemplo, Cowley e colaboradores (1973) propuseram que o sistema barorreflexo não é fundamental para a regulação prolongada da pressão arterial. Os dados prévios sobre o desenvolvimento de hipertensão após a desnervação do nervo do seio carotídeo em animais haviam sido incompletos, presumivelmente como consequência de diferenças metodológicas (Sheffers et al., 2010). Seus dados indicaram que é possível para os barorreceptores e/ou vias centrais do sistema nervoso se adaptar à pressão arterial cronicamente elevada. Esses autores ainda confirmaram que em ratos, o sistema barorreceptor foi menos sensível sob condições de pressão elevada.

Na pesquisa experimental em ratos Zucker, se o prejuízo dos barorreflexos arteriais precede o desenvolvimento da hipertensão ou se aparece após a pressão arterial estar elevada também não é um consenso. Com 7 ou 8 semanas de idade, ratos Zucker obesos machos são normotensos (Schreihof et al. 2007; Osmond et al., 2009). Buñag e Barringer (1988) constataram que a atenuação da sensibilidade barorreflexa está presente em ratos Zucker obesos sem terem sido observadas diferenças na pressão arterial média basal.

No presente estudo, houve a mensuração da pressão arterial no mínimo 30 minutos após a implantação cirúrgica de cateteres na artéria femoral, e isto possibilitaria que o estresse da cirurgia pudesse influenciar os resultados. Contudo, nós não observamos nenhum sinal evidente de dor ou sofrimento no pós-operatório em ratos magros ou obesos. De fato, a duração e a recuperação da cirurgia foram similares entre ambos os grupos. A aparência e o comportamento dos ratos obesos foram também similares aos ratos magros. Além disso, de acordo com os níveis plasmáticos de ACTH (resultados em anexo), não observamos alterações significativas em nenhum dos grupos. Corroborando aos nossos achados, o estudo de Adamopoulos (1998) mostra que pacientes com síndrome X têm sensibilidade do barorreflexo reduzida e uma variabilidade da frequência cardíaca deficiente, mas os níveis plasmáticos de catecolaminas estavam normais.

Demonstramos com os achados do presente estudo que os fatores de risco obesidade, PS e idade foram danosas ao sistema cardiovascular, sendo a obesidade o fator que resultou em piores danos. Em animais jovens, a PS isolada não alterou nenhum dos parâmetros cardiovasculares, enquanto que a idade

produziu um efeito adicional ao risco cardiovascular, um aspecto que poderia ser atribuído aos reflexos tipicamente compensatórios observados no grupo mais velho.

Quando realizamos os mesmos experimentos com ratos machos não encontramos diferenças significativas tão acentuadas quanto em fêmeas (resultados em anexo). Por exemplo, em fêmeas, desde os 3 meses de vida, ratas obesas-PS apresentaram atenuada sensibilidade barorreflexa, enquanto que nos machos não houve qualquer diferença significativa. Também aos 6 e aos 15 meses, a associação entre os fatores de risco ocasionou piores consequências ao controle barorreflexo principalmente quanto à resposta bradicárdica nas fêmeas do que nos ratos machos. Além disso, a associação entre obesidade, PS e idade que alterou todos os parâmetros cardiovasculares analisados em fêmeas (pressão arterial média, frequência cardíaca, resposta barorreflexa bradicárdica e taquicárdica), alterou apenas a resposta barorreflexa taquicárdica em ratos machos.

Nosso estudo corrobora às investigações clínicas as quais demonstram que mulheres têm uma capacidade significativamente menor para regular a pressão arterial e manter a função ortostática em comparação com aos homens (White et al., 1996; Fritsch-Yelle et al., 1994). Na década de 70, Buñag e colaboradores (1975) relataram uma resposta atenuada taquicárdica à hipotensão evocada em ratas fêmeas em comparação aos ratos machos. Em um estudo mais recente, o mesmo grupo demonstrou que ratas apresentaram respostas bradicárdica e taquicárdica atenuadas em comparação aos ratos, mas essas diferenças só foram aparentes em ratos mais velhos (Buñag e Davidow, 1996).

Em mulheres, tem sido descrita uma maior incidência de disfunção postural tem sido descrita e o impacto do gênero sobre o controle autonômico cardíaco

parece desempenhar um papel importante na tolerância ortostática (Barantke et al., 2008). Os mecanismos que contribuem para a diferença de gênero na distribuição do barorreflexo ainda não são conhecidos. Hinojosa-Laborde e colaboradores (1998) consideram algumas possibilidades que apontam que mulheres podem ser protegidas de hipertensão pela alteração do barorreflexo por meio de alguns mecanismos: 1) a ativação do nervo simpático atenuado durante a estimulação dos barorreceptores, 2) uma maior inibição do sistema nervoso simpático durante a estimulação dos barorreceptores ou 3) um aumento da variabilidade da pressão arterial (ou seja, uma menor sensibilidade do barorreflexo).

No caso de mulheres idosas, o sistema vascular é afetado tanto pelo processo de envelhecimento, como pela perda da proteção hormonal, apresentando alto risco para doenças cardiovasculares, como hipertensão, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (Lekontseva et al., 2010).

Em animais eutróficos, com os protocolos de PS e de RS adotados neste estudo foi possível produzir alterações acentuadas no sistema cardiovascular tanto em ratos machos quanto em fêmeas. A frequência cardíaca, por outro lado, foi afetada apenas em ratas fêmeas após a PSP. Como esperado, o estresse do protocolo da PSP aumentou as concentrações de ACTH. A PS também alterou a resposta taquicárdica do barorreflexo cardíaco em ambos os sexos. Nenhuma diferença significativa relacionada ao sexo foi observada para as variáveis cardiovasculares.

A PS de curta duração e a RS crônica resultaram em mudanças similares no peso corporal para machos e para fêmeas quando comparamos as mensurações após o período experimental em relação ao peso basal. Como descrito em um

estudo prévio do nosso grupo, a PSP por 96 horas ocasionou perda do peso corporal em ratos machos (Martins P. et al., 2006). No presente estudo, nós expandimos estes resultados demonstrando que ratas também apresentaram a mesma magnitude de perda de peso, independente da duração do procedimento de PS. A literatura aponta que a PS em ratos, se aplicada por muitos dias, ocasiona perda de peso (Martins P. et al., 2006; Koban et al., 2008).

Em relação ao hormônio do estresse, nossos achados corroboram com achados prévios de nosso grupo em que o ACTH circulante foi significativamente aumentado em ratos PSP após 96 horas (Andersen et al., 2005; Zager et al., 2007). Pode-se justificar que o estresse envolvido nesta técnica da plataforma poderia levar a este efeito. De fato, a perda de sono envolve um nível de estresse inerente e promove diversas alterações em humanos (Spiegel et al., 1999; Martins R. et al., 2010) e em roedores (Andersen et al., 2003, 2005; De Paula e Hoshino, 2004; Fukushiro et al., 2007).

Quando a perda de sono foi prolongada por 3 semanas, não houve mudanças significativas nas concentrações de ACTH em machos nem em fêmeas comparado aos respectivos grupos CTRL. Resultados similares para ratos machos restritos de sono foram encontrados em um estudo prévio do nosso grupo (Zager et al., 2007). É bem aceito que diferentes intensidades de estresse levam a distintas respostas físicas, fisiológicas e psicológicas (Filaire et al., 2004; Papale et al., 2005), e provavelmente o gênero também possa causar respostas distintas. Ratos PSP machos e fêmeas mostraram significativos aumentos nas concentrações de ACTH quando comparado aos respectivos grupos CTRL, sendo a magnitude da resposta mais pronunciada em fêmeas do que em machos (178% e 151%, respectivamente).



Em humanos, os homens tipicamente respondem ao estresse com aumentos mais expressivos nos níveis de catecolaminas do que mulheres (Mills et al., 1996; Schenck-Gustafsson, 1996).

Os diferentes métodos de PS ocasionaram conseqüências específicas em cada sexo. Por exemplo, a resposta taquicárdica à mudanças na pressão arterial foi significativamente reduzida em machos dos grupos PSP e RS comparado ao respectivo grupo CTRL. Em ratas fêmeas, apenas a PSP afetou este parâmetro. A resposta bradicárdica não foi significativamente alterada pela PSP e RS nos grupos de ratos machos e fêmeas os quais exibiram atenuada função barorreflexa comparada ao respectivos grupos CTRL e PSP. Alguns parâmetros que influenciam a sensibilidade barorreflexa são o equilíbrio do sistema nervoso simpático e distensibilidade arterial (Monahan et al., 2001; Tank et al., 2004). Além disso, a sensibilidade barorreflexa parece estar atenuada quando a conformação central da artéria está reduzida (Bonyhay et al., 1996; Monahan et al., 2001).

Embora os achados em ratos obesos indiquem a influência do sexo nas respostas cardiovasculares em ratos eutróficos, tanto os machos quanto as fêmeas mostraram aumento da pressão arterial média e redução da resposta bradicárdica após serem restritos de sono por 21 dias. Similarmente, Tank e colaboradores (2005) relataram que a inclinação das curvas do barorreflexo foi praticamente idêntica em homens e mulheres. Em outro estudo, a análise da atividade nervosa simpática sugere que a função de readaptação foi similar em homens e mulheres (Hinojosa-Laborde et al., 1998).

De acordo com os presentes resultados, embora a RS tenha aumento a pressão arterial média, a PSP parece não contribuir para este aumento, uma vez

que a pressão arterial não foi mais alta comparada aos grupos CTRL tanto em machos quanto em fêmeas. Por outro lado, a frequência cardíaca foi significativamente aumentada apenas no grupo de fêmeas PSP comparada ao respectivo grupo de fêmeas CTRL. Contudo, a RS não induziu quaisquer alterações significativas na frequência cardíaca comparada ao respectivo grupo CTRL do mesmo sexo. Estes dados indicam que os mecanismos cardiovasculares que controlam a pressão arterial e a frequência cardíaca podem ocorrer dependentemente do protocolo de PS, mas independentemente do sexo.

Há evidências crescentes de uma influência dos esteróides sexuais sobre a fisiologia cardiovascular e renal, e suas respectivas fisiopatologia. Estudos epidemiológicos revelam que a prevalência de doenças cardíacas em mulheres premonopausal é menor do que nos homens da mesma idade (Hinojosa-laborde et al., 1998). Da mesma forma, a incidência e a gravidade da hipertensão arterial, principal fator de risco para doença cardíaca, demonstrou ser menor em mulheres do que homens (Schenck-Gustafsson, 1996). É amplamente aceito que mulheres são protegidas contra o desenvolvimento de risco cardiovascular (Hinojosa-Laborde et al., 1998), uma vez que os hormônios femininos são conhecidos por estarem envolvidos em vários processos fisiológicos incluindo a proteção cardíaca do estrogênio (Barret-Connor et al., 1998; Hachul et al., 2008). Desse modo, a redução do tempo de sono observado nas décadas recentes causada por diversos fatores (vida social, luz artificial, trabalho de turno e distúrbios de sono) pode aumentar a morbidade e a mortalidade também por diversas doenças em mulheres (Krishnan e Collop, 2006). Em muitos casos, mulheres exercem um papel duplo de mãe e dona de casa, além da demanda profissional durante os períodos em que elas deveriam

estar descansando. Esta grande quantidade de tarefas pode levar mulheres a também terem um estado de estresse e de RS com conseqüências no ciclo vigília-sono. De acordo com este cenário, nosso estudo demonstrou que a perda de sono afetou similarmente ratos adultos machos e fêmeas. Os presentes dados corroboram investigações prévias que indicam que ratas fêmeas foram afetadas tanto quanto os machos pelo protocolo de perda de sono. Isso indica que os hormônios sexuais não exerceram um efeito protetor contra alterações cardiovasculares neste contexto. Finalmente, nossos achados sugerem um papel da duração de sono na etiologia das respostas cardiovasculares e na concentração de hormônios relacionados do estresse, e que os efeitos foram praticamente semelhantes entre machos e fêmeas no caso de animais eutróficos (Wistar). Quando associamos outros fatores de risco (obesidade, PS e idade), as diferenças entre os sexos foram distintas com conseqüências mais marcantes nas ratas do que ratos (Zucker).

*Conclusões*

## 7.0 CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas pela análise de nossos resultados foram:

1. Os fatores de risco obesidade, privação de sono e idade foram danosos ao sistema cardiovascular, sendo que a obesidade resultou nas piores conseqüências. Em animais obesos jovens, a privação de sono não alterou nenhum dos parâmetros cardiovasculares, enquanto que a idade mais avançada produziu um efeito adicional ao risco cardiovascular.
2. No caso de animais eutróficos, diferentes protocolos de privação de sono levaram a respostas distintas, no entanto, não foram observadas diferenças significativas em relação ao sexo dos animais.
3. De acordo com os achados do presente estudo, sugere-se que não há uma relação direta entre a disfunção do reflexo barorreceptor e o aumento da pressão arterial.

*Referências  
Bibliográficas*

## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamopoulos S, Rosano GM, Ponikowski P, Cerquetani E, Piepoli M, Panagiota F, Collins P, Poole-Wilson P, Kremastinos D e Coats AJ. Impaired baroreflex sensitivity and sympathovagal balance in syndrome X. *Am J Cardiol* 82: 862-868, 1998.
- Andersen ML, Bignotto M e Tufik S. Cocaine-induced genital reflexes during paradoxical sleep deprivation and recovery. *Physiol Behav* 78: 255-259, 2003.
- Andersen ML, Martins PJF, D'Almeida V, Santos RF, Bignotto M e Tufik S. Effects of paradoxal sleep deprivation on blood parameters associated with cardiovascular risk in aged rats. *Exp Gerontol* 39: 817-824, 2004a.
- Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE e Tufik S. Procedimento experimental. In: Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, Princípios éticos e práticos do uso de animais de laboratório. São Paulo, Brazil; 2004b: p. 45-69.
- Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M e Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res* 14: 83-90, 2005.
- Andersen ML e Tufik S. The effects of testosterone on sleep and sleep-disordered breathing in men: its bidirectional interaction with erectile function. *Sleep Med Rev* 12: 365-379, 2008.
- Andersen ML, Valle AC do, Laria CT e Tufik S. Implantação de eletrodos para o estudo eletrofisiológico do ciclo vigília-sono do rato. 1ª. ed. São Paulo: CLR Balieiro Editores Ltda; 2001: p. 62.

- Antunes IB, Andersen ML, Alvarenga TA e Tufik S. Effects of paradoxal sleep deprivation on blood parameters associated with cardiovascular risk in intact and ovariectomized rats compared with male rats. *Behav Brain Res* 176: 187-192, 2007.
- Antunes IB, Andersen ML, Baracat EC e Tufik S. The effects of paradoxal sleep deprivation on estrous cycles of the female rats. *Hormones Behavior* 49: 433-440, 2006.
- Argilés JM. The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism. *Prog Lipid Res* 28: 53-66, 1989.
- Armitage R, Smith C, Thompson S e Hoffmann R. Sleep Research Sex Differences in Slow-Wave Activity in Response to Sleep Deprivation *Online* 4: 33-41, 2001.
- Ayas NT, White DP, Manson JE, Stampfer MJ, Speizer FE, Malhotra A e Hu FB. A prospective study of sleep duration and coronary heart disease in women. *Arch Intern Med* 163: 205-209, 2003.
- Barantke M, Krauss T, Ortak J, Lieb W, Reppel M, Burgdorf C, Pramstaller PP, Schunkert H e Bonnemeier H. Effects of gender and aging on differential autonomic responses to orthostatic maneuvers. *J Cardiovasc Electrophysiol* 19: 1296-1303, 2008.
- Barret-Connor E e Grady D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health* 19: 55-72, 1998.
- Barringer DL e Buñag RD. Uneven blunting of chronotropic baroreflexes in obese Zucker rats. *Am J Physiol* 256: H417-H421, 1989.
- Bass S e Ritter S. Decreased beta-adrenergic receptor binding in obese female Zucker rats. *J Auton Nerv Syst* 14: 81-87, 1985.



- Benedetti F, Barbini B, Fulgosi MC, Colombo C, Dallaspezia S, Pontiggia A e Smeraldi E. Combined total sleep deprivation and light therapy in the treatment of drug-resistant bipolar depression: acute response and long-term remission rates. *J Clin Psychiatry* 66: 1535-1540, 2005.
- Bonnet MH e Arand DL. We are chronically sleep deprived. *Sleep* 18: 908-911, 1995.
- Bonyhay I, Jokkel G e Kollai M. Relation between baroreflex sensitivity and carotid artery elasticity in healthy humans. *Am J Physiol* 271: H1139-H1144, 1996.
- Bray GA. The Zucker-fatty rat: a review. *Federation Proceedings* 36: 148-153, 1977.
- Bryant PA, Trinder J e Curtis N. Sick and tired: does sleep have a vital role in the immune system? *Nat Rev Immunol* 4: 457-467, 2004.
- Buñag RD e Barringer DL. Obese Zucker rats, though still normotensive, already have impaired chronotropic baroreflexes. *Clin Exp Hypertens Suppl* 1: 257-262, 1988.
- Buñag RD, Krizsan D e Itoh H. Diminished cardiovascular responsiveness to vagal stimulation in obese rats. *Am J Physiol* 259: 842-848, 1990.
- Buñag RD, Walaszek EJ e Mueting N. Sex differences in reflex tachycardia induced by hypotensive drugs in unanesthetized rats. *Am J Physiol* 229: 652-656, 1975.
- Buñag RD e Davidow LW. Aging impairs heart rate reflexes earlier in female than in male Sprague-Dawley rats. *Neurobiol Aging* 17: 87-93, 1996.
- Castanho VS, Oliveira LS, Pinheiro HP, Oliveira HCF e Faria EC. Sex differences in risk factors for coronary heart disease: a study in a brazilian population. *BMC Public Health* 1: 3, 2001.
- Copinschi G. Metabolic and endocrine effects of sleep deprivation. *Essent Psychopharmacol* 6: 341-347, 2005.

- Corbett EK, Mary DA, McWilliam PN e Batten TF. Age-related loss of cardiac vagal preganglionic neurones in spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol* 92: 1005-1013, 2007.
- Correia ML, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL e Haynes WG. Leptin acts in the central nervous system to produce dose-dependent changes in arterial pressure. *Hypertension* 37: 936-942, 2001.
- Cowley AW Jr., Liard JF e Guyton AC. Role of baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs. *Circ Res* 32: 564-576, 1973.
- Crandall CG, Cui J e Wilson TE. Effects of heat stress on baroreflex function in humans. *Acta Physiol Scand* 177: 321-328, 2003.
- Crandall ME e Heesch CM. Baroreflex control of sympathetic outflow in pregnant rats: effects of captopril. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 258: R1417-R1423, 1990.
- Crispim CA, Waterhouse J, Dâmaso AR, Zimberg IZ, Padilha HG, Oyama LM, Tufik S e de Mello MT. Hormonal appetite control is altered by shift work: a preliminary study. *Metabolism*. No prelo.
- De Angelis K, Santos MSB e Irigoyen MC. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul* 3: 1-7, 2004.
- De Paula HM e Hoshino K. Potentiation of panic-like behaviours of the rat by subconvulsive doses of strychnine. *Physiol Behav* 80: 459-464, 2004.
- Dement W e Kleitman N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 9: 673-690, 1957.

- Diemen VV, Trindade EN e Trindade MRM. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 21: 425-429, 2006.
- Domitila A, Huberand Ann e M.Schreihofe. Attenuated baroreflex control of sympathetic nerve activity in obese Zucker rats by central mechanisms. *J Physiol* 588: 1515-1525, 2010.
- Drager LF, Bortolotto LA, Figueiredo AC, Krieger EM e Lorenzi GF. Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 706-712, 2007.
- Durmer JS e Dinges DF. Neurocognitive consequences of sleep de-privation. *Semin Neurol* 1: 117-129, 2005.
- Elmqvist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiol Behav* 7: 703-708, 2001.
- Esler M, Straznicky N, Eikelis N, Masuo K, Lambert G e Lambert E. Mechanisms of sympathetic activation in obesity-related hypertension. *Hypertension* 48: 1-10, 2006.
- Everson CA, Laatsch CD e Hogg N. Antioxidant defense responses to sleep loss and sleep recovery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: 374-383, 2005.
- Farah VM, Moreira ED, Pires MD, Irigoyen MC e Krieger EM. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. *Braz J Med Biol Res* 32: 361-369, 1999.
- Filaire E, Bonis J e Lac G. Relationships between physiological and psychological stress and salivary immunoglobulin A among young female gymnasts. *Percept Mot Skills* 99: 605-617, 2004.

- Flegal KM, Graubard BI, Williansom DF e Gail MH. Cause specific excess deaths associated with underweight, overweight and obesity. *JAMA* 298: 2028-2037, 2007.
- Fritsch-Yelle JM, Charles JB, Jones MM, Beightol LA e Eckberg DL. Spaceflight alters autonomic regulation of arterial pressure in humans. *J Appl Physiol* 77: 1776-1783, 1994.
- Fukushiro DF, Calzavara MB, Trombin TF, Lopez GB, Abílio VC, Andersen ML, Tufik S e Frussa-Filho R. Effects of environmental enrichment and paradoxical sleep deprivation on open-field behavior of amphetamine-treated mice. *Physiol Behav* 92: 773-779, 2007.
- Gallagher KM, Fadel PJ, Smith SA, Stromstad M, Ide K, Secher NH e Raven PB. The interaction of central command and the exercise pressor reflex in mediating baroreflex resetting during exercise in humans. *Exp Physiol* 91: 79-87, 2006.
- Gangwisch JE, Malaspina D, Boden-Albala B e Heymsfield SB. Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES. *Sleep* 28: 1289-1296, 2005.
- Gilbert EL e Ryan MJ. High dietary fat promotes visceral obesity and impaired endothelial function in female mice with systemic lupus erythematosus. *Gend Med* 8: 150-155, 2011.
- Grassi G. Leptin, sympathetic nervous system and baroreflex function. *Curr Hypertens* 6: 236-240, 2004.
- Grassi G. Sympathetic deactivation as a goal of nonpharmacologic and pharmacologic antihypertensive treatment: rationale and options. *Curr Hypertens Rep* 5: 277-280, 2003.

- Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A e Mancia G. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension* 31: 68-72, 1998.
- Grassi G e Mancia G. Arterial baroreflexes and other cardiovascular reflexes in hypertension. In: *Textbook of hypertension*. Swales JD (Ed.) Oxford, Black-well Sci Pub. 397-408, 1994.
- Greenspan SF. *Endocrinologia Básica e Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000: p.322-332.
- Hachul H, Bittencourt LR, Andersen ML, Haidar MA, Baracat EC e Tufik S. Effects of hormone therapy with estrogen and/or progesterone on sleep pattern in postmenopausal women. *Int J Gynaecol Obstet* 103: 207-212, 2008.
- Haibara AS e Santos RAS. Descobrimiento e importância dos barorreceptores. *Rev Bras Hipertensão* 7: 113-115, 2000.
- Hall JE, Hildebrandt DA e Kuo J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am J Hypertens* 14: 103-115, 2001.
- Hariri N e Thibault L. Dietary Obesity Caused by a Specific Circadian Eating Pattern. *Chronobiol Int* 28: 216-228, 2011.
- Hasler G, Buysse DJ, Klaghofer R, Gamma A, Ajdacic V, Eich D, Rössler W e Angst J. The association between short sleep duration and obesity in young adults: a 13-year prospective study. *Sleep* 27: 661-666, 2004.
- Hasser EM e Moffitt JA. Regulation of sympathetic nervous system function after cardiovascular deconditioning. *Ann New York Acad Sci* 940: 454-968, 2001.
- Head GA e Burke SL. Renal and cardiac sympathetic baroreflexes in hypertensive rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 972-975, 2001.

- Heymans C e Bouckaert JJ. Sinus caroticus and respiratory reflexes: Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *J Physiol* 69: 254-266, 1930.
- Hinojosa-Laborde C, Chapa I, Lange D e Haywood JR. Gender differences in sympathetic nervous system regulation. *Clinical and Experimental Pharmacol and Physiol* 26: 122-126, 1998.
- Hirsch J, Leibel R, Mackintosh R e Aguirre A. Heart rate variability as a measure of autonomic function during weight change in humans. *Regul Inte and Compreh Physiol* 30: 1418-1423, 1991.
- Hofmann KL, Mussgay L e Ruddel H. Autonomic cardiovascular regulation in obesity. *J Endocrinol* 164: 59-66, 2000.
- Hubert HB, Feinleib M, MacNamara PM e Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 67: 968-977, 1983.
- Jin X, Fukuda N, Su J, Takagi H, Lai Y, Lin Z, Kanmatsuse K, Wang ZW e Unger RH. Effects of leptin on endothelial function with OB-Rb gene transfer in Zucker fatty rats. *Atherosclerosis* 169: 225-233, 2003.
- Johnson FK, Johnson RA, Durante W, Jackson KE, Stevenson BK e Peyton KJ. Metabolic syndrome increases endogenous carbon monoxide production to promote hypertension and endothelial dysfunction in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: 601-608, 2006.
- Jouvet M. Recherches sur les stuctures nerveuses et les mecanismes reponsables des differentes phases du sommeil physiologique. *Archives Italiennes de Biologie* 100: 125-206, 1962.

- Kannel WB. The Framingham study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women. *J Gend Specif Med* 5: 27, 2002.
- Kannel WB e Wilson PW. Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch Intern Med* 155: 57-61, 1995.
- Knutson KL, Ryden AM, Mander BA e Cauter EV. Role of sleep duration and quality in the risk and severity of type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 166: 1768-1774, 2006.
- Krishnan V e Collop NA. Gender differences in sleep disorders. *Curr Opin Pulm Med* 12: 383-389, 2006.
- Koban M, Sita LV, Le WW e Hoffman GE. Sleep deprivation of rats: the hyperphagic response is real. *Sleep* 31: 927-933, 2008.
- Kuo TB, Lin T, Yang CC, Li CL, Chen CF e Chou P. Effect of aging on gender differences in neural control of heart rate. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 277: 2233-2239, 1999.
- Kuriyama K, Mishima K, Soshi T, Honma M e Kim Y. Effects of sex differences and regulation of the sleep-wake cycle on aversive memory encoding. *Neurosci Res* 70: 104-110, 2011.
- Kurtz TW, Morris RC e Pershadsingh HA. The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension* 13: 896-901, 1989.
- La Rovere MT, Bigger JT, Marcus FI, Mortara A e Schuartz PJ. ATRAMI Investigators. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet* 351: 478-484, 1998.

- La Rovere MT, Specchia G, Mortara A e Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity, clinical correlates and cardiovascular mortality among patients with a first myocardial infarction. A prospective study. *Circulation* 78: 816-824, 1988.
- La Rovere MT, Pinna GD, Hohnloser SH, Marcus FI, Mortara A, Nohara R, Bigger JT Jr, Camm AJ e Schwartz PJ. ATRAMI Investigators. Autonomic tone and reflexes after myocardial infarction. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the identification of patients at risk for life-threatening arrhythmias: implications for clinical trials. *Circulation*. 103: 2072-2077, 2001.
- Laitinen T, Hartikainen J, Vanninen E, Niskanen L, Geelen G e Lansimies E. Age and gender dependency of baroreflex sensitivity in health subjects. *J Appl Physiol* 84: 576-583, 1983.
- Laudanski K e Cudnoch-Jedrzejewska A. Effects of ovariectomy on the regulation of cardiovascular functions in female Wistar rats. *Med Sci Monit* 7: 1188-1192, 2001.
- Lee LV e Foody JM. Women and Heart Disease. *Cardiol Clin* 29: 35-45, 2011.
- Leibowitz SM, Brooks SN e Black JE. Excessive daytime sleepiness: considerations for the psychiatrist. *Psychiatr Clin North Am* 29: 921-945, 2006.
- Lekontseva O, Chakrabarti S e Davidge ST. Endothelin in the female vasculature: a role in aging? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: 509-516, 2010.
- Lohmeier TE, Hildebrandt DA, Warren S, May PJ e Cunningham JT. Recent insights into the interactions between the baroreflex and the kidneys in hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: 828-836, 2005.



- Lorenzi-Filho G e Bradley TD. Cardiac function in sleep apnea. In: Pack AI. Sleep Apnea: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. New York: M Dekker; 2002: p. 377-410.
- Logan AG, Perlikowski SM, Mente A, Tisler A, Tkacova R, Niroumand M, Leung RS e Bradley TD. High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. *J Hypertens* 19: 2271-2277, 2001.
- Loures DL, Sant'Anna I, Baldotto CSR, Sousa EB e Nóbrega ACLN. Estresse mental e sistema cardiovascular. *Arq Bras Cardiol* 78: 525-530, 2002.
- Machado RB, Hipólido DC, Benedito-Silva AA e Tufik S. Sleep deprivation induced by multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res* 1004: 45-51, 2004.
- Machado RB, Suchecki D e Tufik S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. *Behav Brain Res* 160: 356-364, 2005.
- Martins PJ, D'Almeida V, Nobrega JN e Tufik S. A reassessment of the hyperphagia/weight-loss paradox during sleep deprivation. *Sleep* 29: 1233-1238, 2006.
- Martins RC, Andersen ML, Garbuio SA, Bittencourt LR, Guindalini C, Shih MC, Hoexter MQ, Bressan RA, Castiglioni ML e Tufik S. Dopamine transporter regulation during four nights of REM sleep deprivation followed by recovery-an in vivo molecular imaging study in humans. *Sleep* 33: 243-251, 2010.
- Meagher EA. Addressing cardiovascular disease in women: Focus on dyslipidemia. *J Am Board Fam Pract* 17: 424-437, 2004.

- Mills PJ, Ziegler MG, Nelesen RA e Kennedy BP. The effects of the menstrual cycle, race, and gender on adrenergic receptors and agonists. *Clin Pharmacol Ther* 60: 99-104, 1996.
- Monahan KD, Dinunno FA, Seals DR, Clevenger CM, Desouza CA e Tanaka H. Age-associated changes in cardiovagal baroreflex sensitivity are related to central arterial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: 284-289, 2001.
- Moore RL. A study of the hering-breuer reflex. *J Exp Med* 46: 819-837, 1927.
- Mortara A, Rovere MTL, Pinna GD, Prpa A, Maestri R, Febo O, Pozzoli M, Opasich C e Tavazzi L. Arterial baroreflex modulation of heart rate in chronic heart failure. *Circulation* 96: 3450-3458, 1997.
- Nagai R, Nagata S, Fukuya F, Higaki J, Rakugi H, Ogihara T. Changes in autonomic activity and baroreflex sensitivity with the hypertension process and age in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 419-425, 2003.
- Nagai M, Hoshida S e Kario K. Sleep Duration as a Risk Factor for Cardiovascular Disease- a Review of the Recent Literature. *Current Cardiology Reviews* 6: 54-61, 2010.
- Nagura S, Sakagami T, Kakiichi A, Yoshimoto M e Miki K. Acute shifts in baroreflex control of renal sympathetic nerve activity induced by REM sleep and grooming in rats. *J Physiol* 558: 975-983, 2004.
- National Sleep Foundation: Sleep in America Poll 2003. Washington, DC, National Sleep Foundation, 2003.
- Osmond JM, Mintz JD, Dalton B e Stepp DW. Obesity increases blood pressure, cerebral vascular remodeling, and severity of stroke in the Zucker rat. *Hypertension* 53: 381-386, 2009.

- Osterziel KJ, Hänlein D, Willenbrock R, Eichhorn C, Luft F e Dietz R. Baroreflex sensitivity and cardiovascular mortality in patients with mild to moderate heart failure. *Br Heart J* 73: 517-522, 1995.
- Pamidimukkala J e Jandhyala BS. Evaluation of hemodynamics, vascular reactivity and baroreceptor compensation in the insulin resistant Zucker obese rats. *Clin Exp Hypertens* 18: 1089-1104, 1996.
- Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam A, Diwan V, Kauter K, Sernia C, Campbell F, Ward L, Gobe G, Fenning A e Brown L. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 57: 51-64, 2011.
- Papale LA, Andersen ML, Antunes IB, Alvarenga TA e Tufik S. Sleep pattern in rats under different stress modalities. *Brain Res* 1060: 47-54, 2005.
- Papale LA, Paul KN, Sawyer NT, Manns JR, Tufik S e Escayg A. Dysfunction of the Scn8a voltage-gated sodium channel alters sleep architecture, reduces diurnal corticosterone levels, and enhances spatial memory. *J Biol Chem* 285: 16553-16561, 2010.
- Radulovacki M, Trbovic S e Carley DW. Hypotension reduces sleep apneas in Zucker lean and Zucker obese rats. *Sleep* 19: 767-773, 1996.
- Ramirez-Expósito MJ e Martínez-Martos JM. Hypertension, RAS, and gender: what is the role of aminopeptidases? *Heart Fail Rev* 13: 355-365, 2008.
- Rivera L, Morón R, Zarzuelo A e Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 77: 1053-1063, 2009.

- Ruiz FS, Andersen ML, Martins RC, Zager A, Lopes JD e Tufik S. Immune alterations after selective rapid eye movement or total sleep deprivation in healthy male volunteers. *Innate Immun*, 2011, no prelo.
- Ruiz FS, Andersen ML, Zager A, Martins RC e Tufik S. Sleep deprivation reduces the lymphocyte count in a non-obese mouse model of type 1 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* 40: 633-637, 2007.
- Saleh MC, Connell BJ e Saleh TM. Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats. *Brain Res* 879: 105-114, 2000.
- Shamsuzzaman ASM, Caples SM e Somers VK. Sleep deprivation and circulatory control. *Sleep* 26: 986-989, 2003.
- Schenck-Gustafsson K. Risk factors for cardiovascular disease in women: Assessment and management. *Eur Heart J* 17: 2-8, 1996.
- Sheffers IJM e Kroon AA. Carotid baroreflex activation: past, present and future. *Curr Hypertens Rep* 12: 61-66, 2010.
- Schreihof AM, Mandel DA, Mobley SC e Stepp DW. Impairment of sympathetic baroreceptor reflexes in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: 2543-2549, 2007.
- Schulman IH e Raji L. Salt sensitivity and hypertension after menopause: role of nitric oxide and angiotensin II. *Am J Nephrol* 26: 170-180, 2006.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P e Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98: 1101-1106, 1996.
- Silva A, Andersen ML, De Mello MT, Bittencourt LRA, Peruzzo D e Tufik S. Gender and age differences in polysomnographies findings and sleep complaints in

- patients referred to a sleep laboratory. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 41: 1067-1075, 2008.
- Spiegel K, Tasali E, Penev P e Van Cauter E. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Annals of Internal Medicine* 141: 846-820, 2004a.
- Spiegel K, Leproult R, L'hermite-Baleriaux M, Copinschi G, Penev PD e Van Cauter E. Leptin levels are dependent on sleep duration: relationships with sympathovagal balance, carbohydrate regulation, cortisol and thyrotropin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89: 5762-5771, 2004b.
- Spiegel K, Leproult R e Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 354: 1435-1439, 1999.
- Stevenson JC, Crook D e Godsland IF. Effects of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. *Arteriosc* 98: 83-90, 1993.
- Styne DM. Childhood and adolescent obesity. Prevalence and significance. *Pediatr Clin North Am* 48: 823-854, 2001.
- Su DF, Cerutti C, Barres C, Vincent M e Sassard J. Blood pressure and baroreflex sensitivity in conscious hypertensive rats of Lyon strain. *American Journal of Physiology* 251: 1111-1117, 1986.
- Sudo N e Ohtsuka R. Nutrient intake among female shift workers in a computer factory in Japan. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52: 367-378, 2001.

- Taheri S, Lin L, Austin D, Young T e Mignot E. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Medicine* 1: 62, 2004.
- Tanaka M e Nishikawa T. Effects of nitrous oxide on baroreflex gain and heart rate variability. *Acta Anaesthesiol Scand* 48: 1163-1167, 2004.
- Tank J, Diedrich A, Szczech E, Luft FC e Jordan J. Alpha-2 adrenergic transmission and human baroreflex regulation. *Hypertension* 43: 1035-1041, 2004.
- Tank J, Diedrich A, Szezech E, Luft FC e Jordan J. Baroreflex regulation of heart rate and sympathetic vasomotor tone in women and men. *Hypertension* 45: 1159-1164, 2005.
- Tappy L, Lê KA, Tran C e Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition* 26: 1044-1049, 2010.
- Thrasher TN. Baroreceptors and the long-term control of blood pressure. *Exp Physiol* 89: 331-335, 2004.
- Timo-laria C e Kadekaro M. A simple device to align vertically electrodes for stereotaxic implantation. *Physiol Behav* 5: 541-542, 1970.
- Trenell MI, Marshall NS e Rogers NL. Sleep and metabolic control: waking to a problem? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34: 1-9, 2007.
- Tufik S, Andersen ML, Bittencourt LR e Mello MT. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *An Acad Bras Cienc.* 81: 521-538, 2009.
- Van Dijk G, Thiele TE, Donahey JC, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Bernstein IL, Woods SC e Seeley RJ. Central infusions of leptin and GLP-1-(7–36) amide

- differentially stimulate c-FLI in the rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 27: 1096-1100, 1996.
- Vorona R, Winn M, Babineau T, Eng B, Feldman H e Ware J. Overweight and obese patients in a primary care population report less sleep than patients with a normal body mass index. *Archives of Internal Medicine* 165: 25-30, 2005.
- Wang Y, Monteiro CA e Popkin BM. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia. *Am J Clin Nutr* 75: 971-977, 2002.
- White DD, Gotshall RW e Tucker A. Women have lower tolerance to lower body negative pressure than men. *J Appl Physiol* 80: 1138-1143, 1996.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H e Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med* 162: 1867-1872, 2002.
- Wingard DL. Sex differences and coronary heart disease. A case of comparing apples and pears? *Circulation* 81: 1710-1712, 1990.
- Wingard DL e Berkman LF. Mortality risk associated sleeping patterns among adults. *Sleep* 6: 102-107, 1983.
- Wolk R, Gami AS, Touchard AG e Somers VK. Sleep and cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol* 30: 625-662, 2005.
- Zager A, Andersen ML, Lima MM, Reksidler AB, Machado RB e Tufik S. Modulation of sickness behavior by sleep: the role of neurochemical and neuroinflammatory pathways in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 19: 589-602, 2009.

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



# *Anexo I*

São Paulo, 7 de novembro de 2008.  
**CEP 1268/08**

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) MONICA LEVY ANDERSEN  
Co-Investigadores: Neuli Maria Tenório, Cássia M de Toledo Bergamaschi, Ruy Ribeiro de Campos Junior  
Disciplina/Departamento: Psicobiologia/Biologia e Medicina do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: AFIP.

### **PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL**

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Efeitos da privação de sono sobre os parâmetros cardiovasculares em ratos machos e fêmeas”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimentatl, categoria B- estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Verificar as alterações cardiovasculares relacionadas à privação de sono isoladamente e quando associada à obesidade..

RESUMO: Estudo com ratos Wistar e Zucker. Anestésico: halotano. Analgésico: xilocaína. Eutanásia: ovedose intravenosa de anestésico (hidrato de cloral) + decapitação. Serão utilizados ratos adultos Wistar e Zucker (obesos e magros) machos e fêmeas. Serão avaliadas variáveis cardiovasculares (pressão arterial, frequência cardíaca e índice de sensibilidade barorreflexa), quanto aos efeitos da privação de sono paradoxal ou total e quanto ao sexo dos animais. Os animais serão submetidos à privação de sono paradoxal por 24h ou 96h pelo método da plataforma única. Para restrição de sono, os animais serão submetidos à privação de sono por meio do método da plataforma única por 18h durante 21 dias. Serão realizadas dosagens da concentração de testosterona, progesterona, estradiol e corticosterona, realizadas no Laboratório da AFIP..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A privação de sono e obesidade, são importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares, com respostas distintas de acordo com as características sexuais. Este estudo visa avaliar a relação entre a privação de sono e ocorrências de distúrbios cardiovasculares, bem como averiguar a participação das características sexuais nessas relações..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: AFIP.

CRONOGRAMA: 18 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **2/11/2009** e **2/11/2010**.

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

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

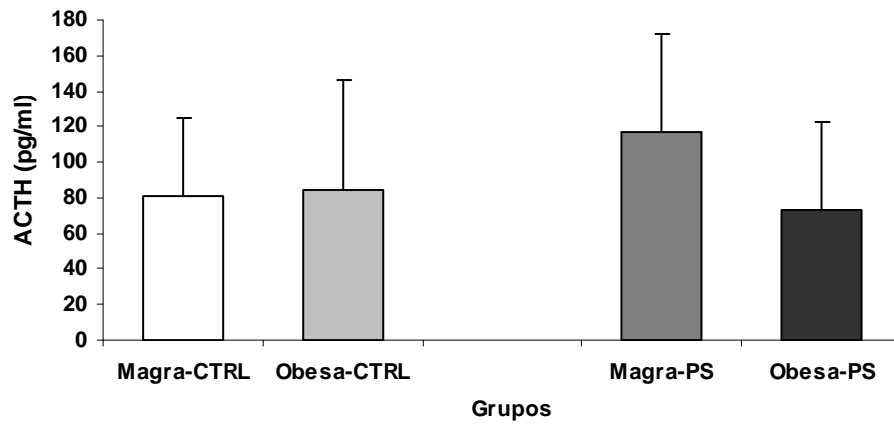
Atenciosamente,



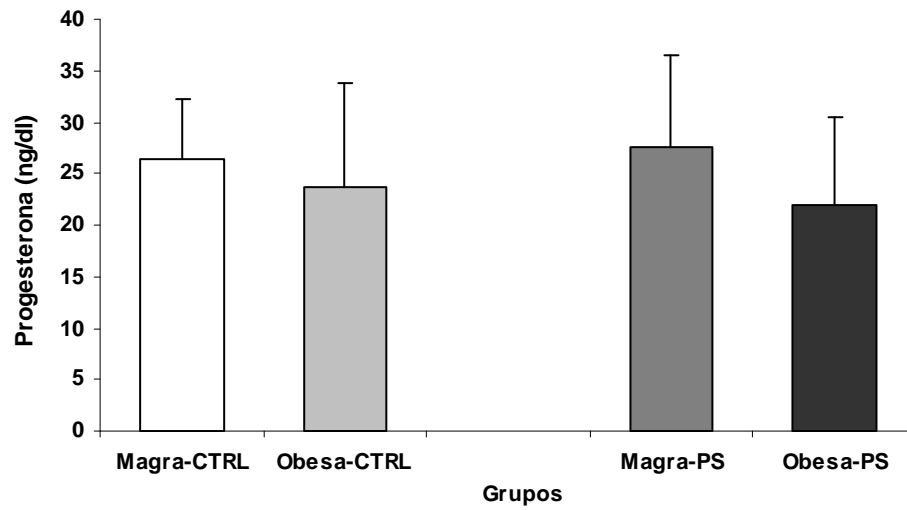
**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

# *Anexo II*

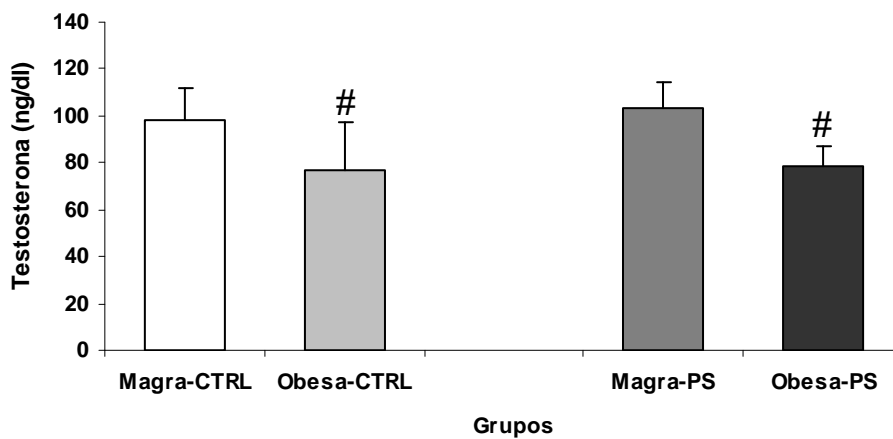
A



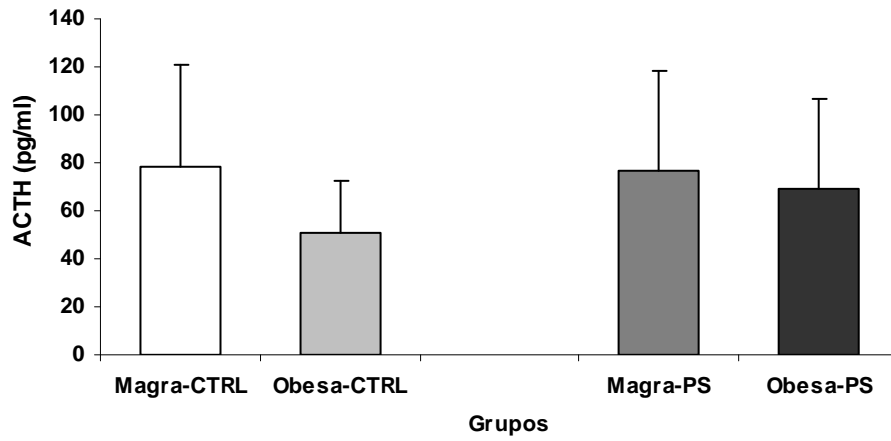
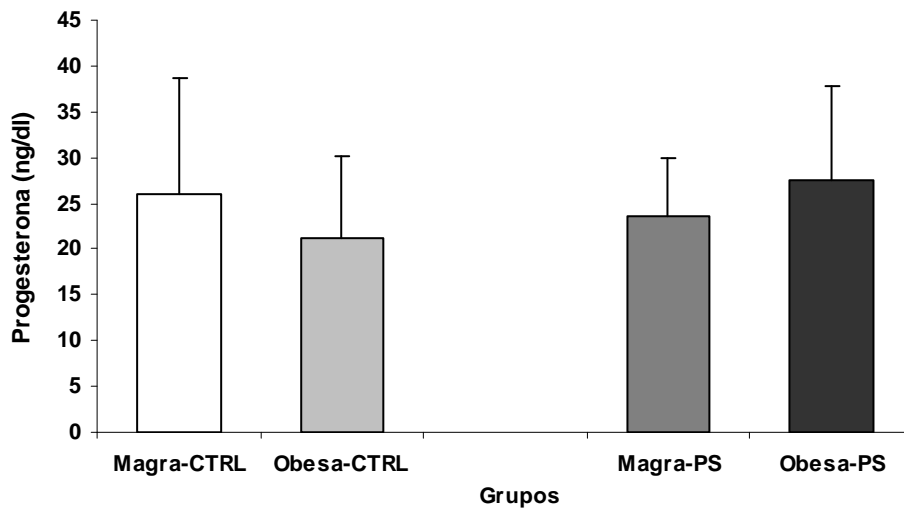
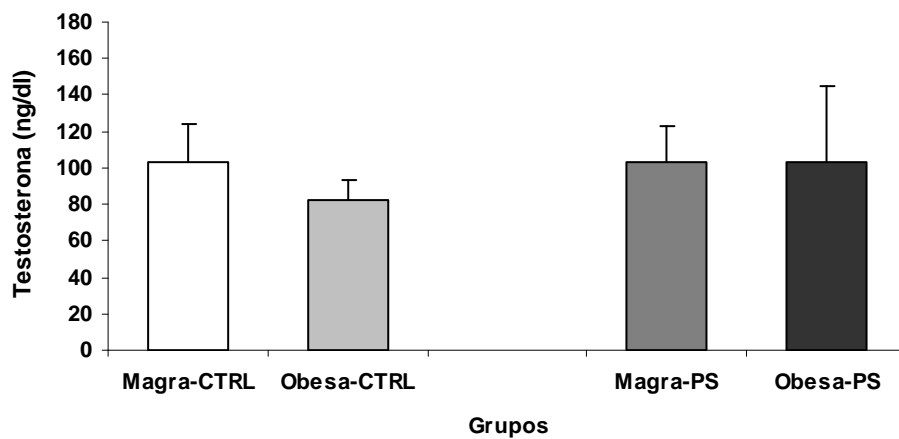
B



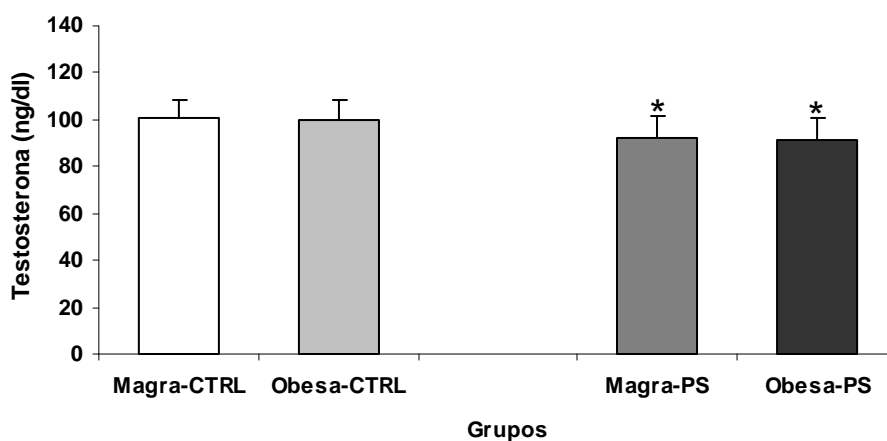
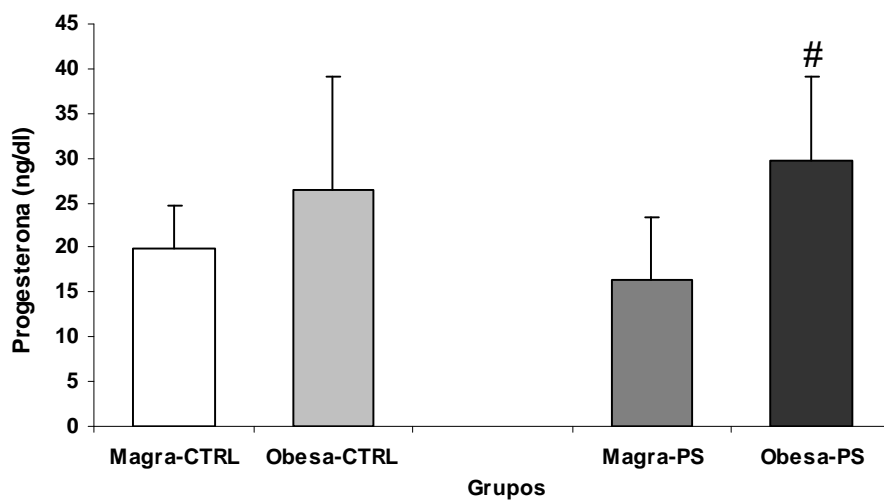
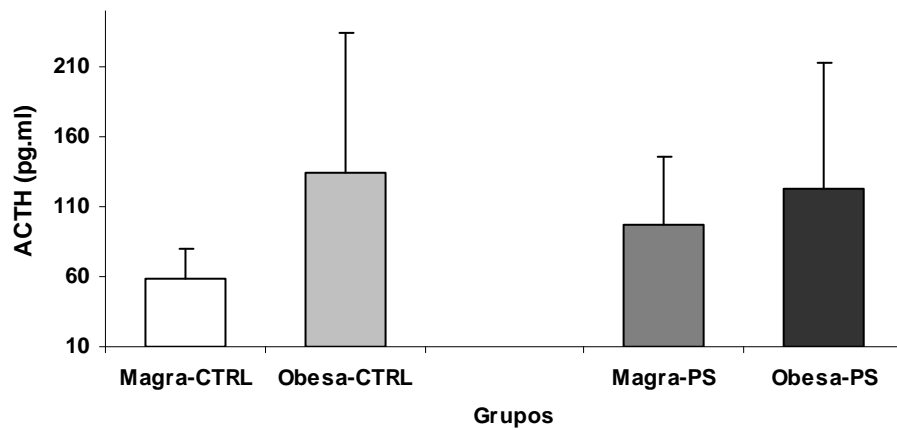
C



**Fig. 1.** Níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (A), progesterona (B) e testosterona (C) em ratas Zucker magras e obesas controle (CTRL) e privadas de sono (PS) de 3 meses de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. # Difere do respectivo grupo magro.

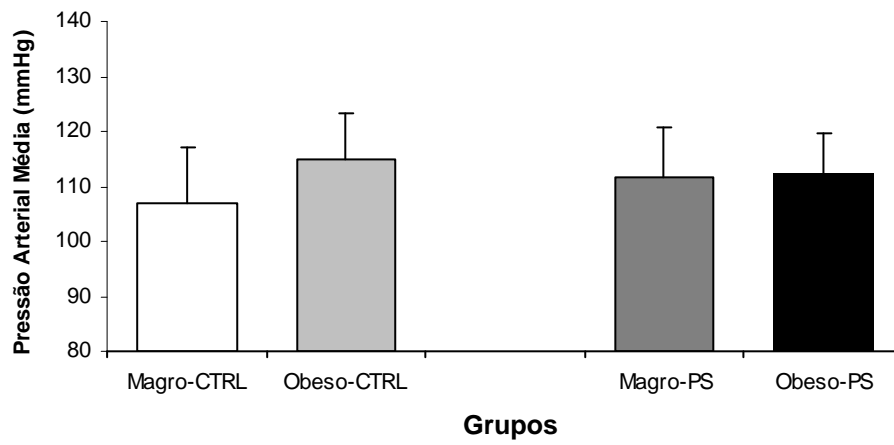
**A****B****C**

**Fig. 2.** Níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (A), progesterona (B) e testosterona (C) em ratas Zucker magras e obesas controle (CTRL) e privadas de sono (PS) de 6 meses de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão.

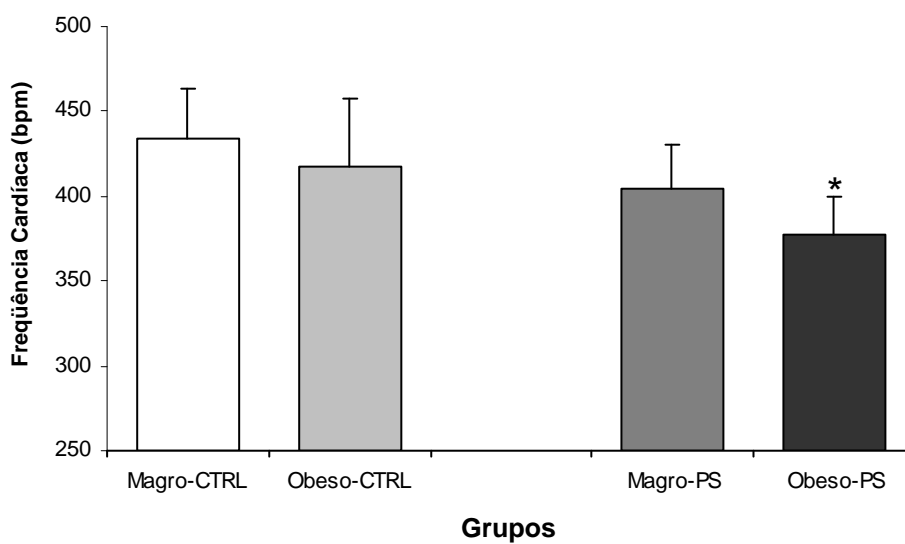


**Fig. 3.** Níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (A), progesterona (B) e testosterona (C) em ratas Zucker magras e obesas controle (CTRL) e privadas de sono (PS) de 15 meses de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. \* Difere do grupo controle. # Difere do respectivo grupo magro.

**A**



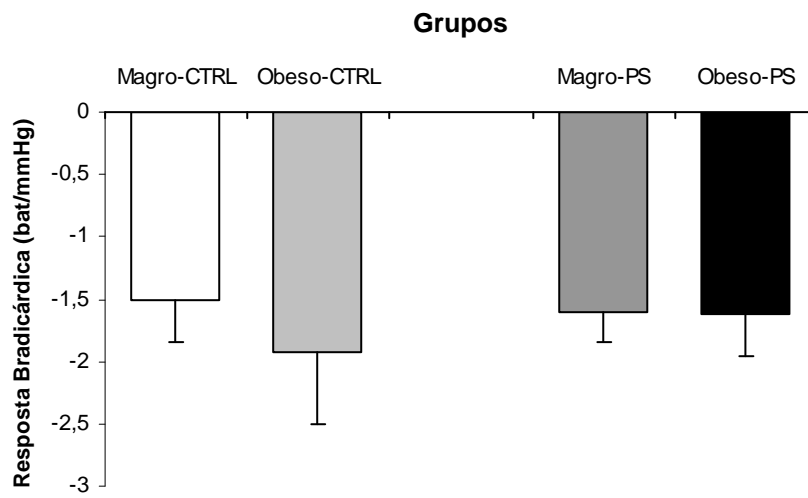
**B**



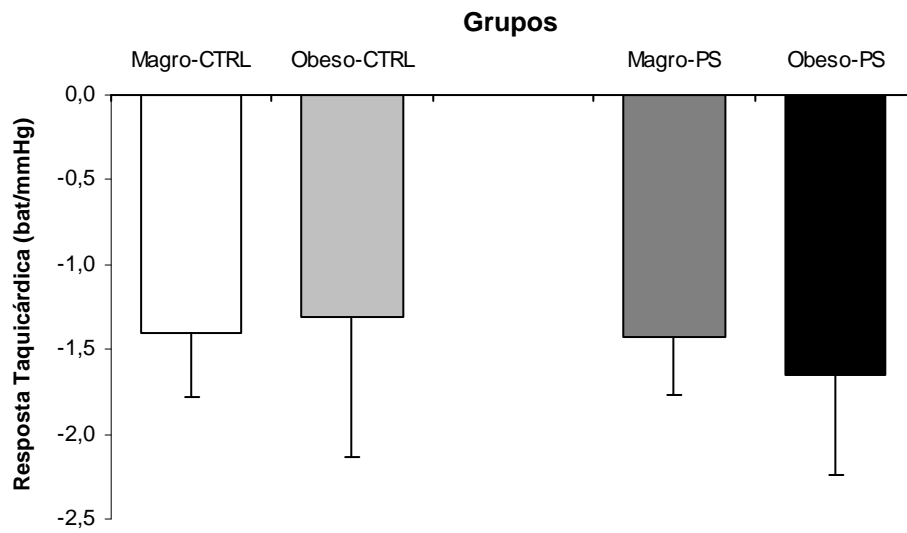
**Fig. 4** Valores de média  $\pm$  DP da pressão arterial média **(A)**, frequência cardíaca **(B)** em ratos Zucker machos CTRL (controle) e PS (privados de sono) em ratos de 3 meses de idade. \*Diferente do grupo controle.



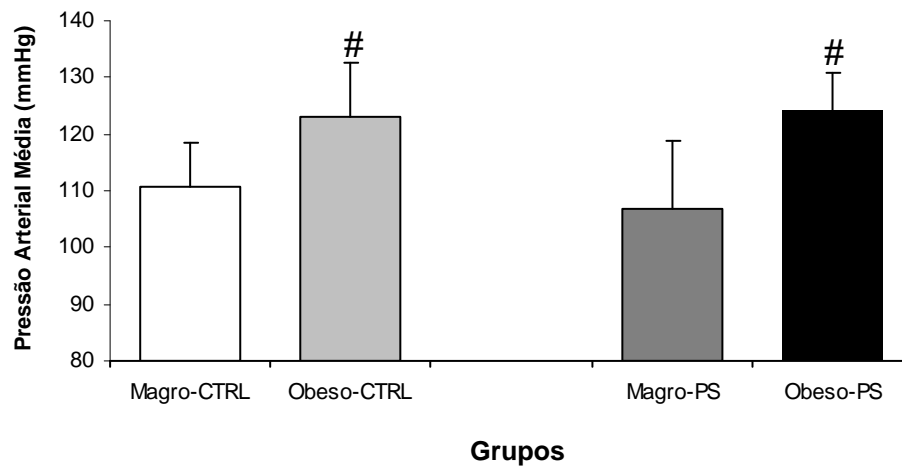
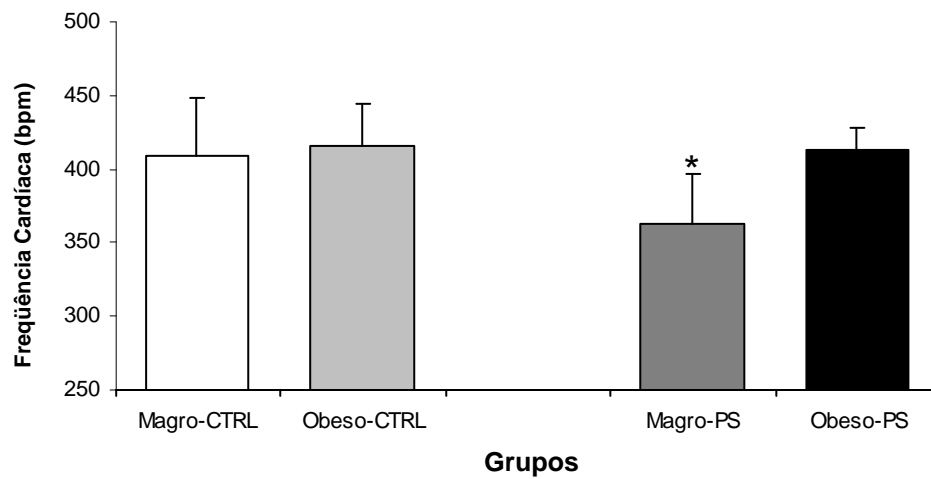
C



D

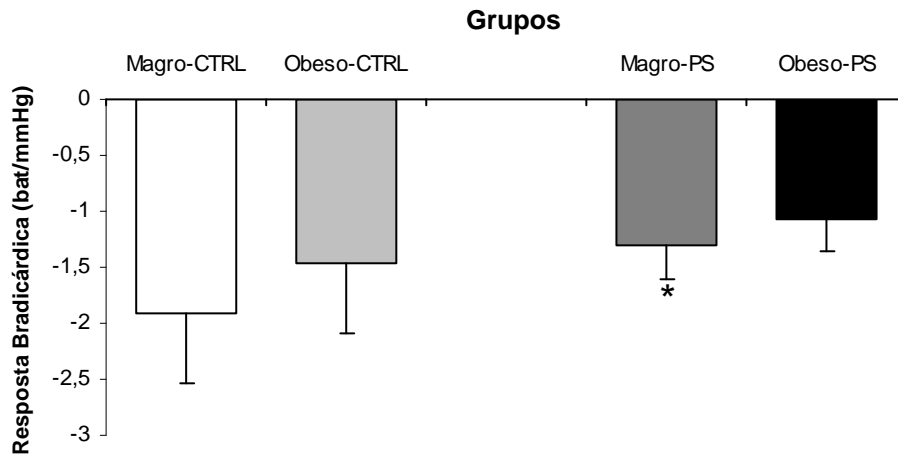


**Fig. 5** Valores de média  $\pm$  DP da resposta bradicárdica **(C)** e resposta taquicárdica **(D)** em ratos Zucker machos CTRL (controle) e PS (privados de sono) em ratos de 3 meses de idade.

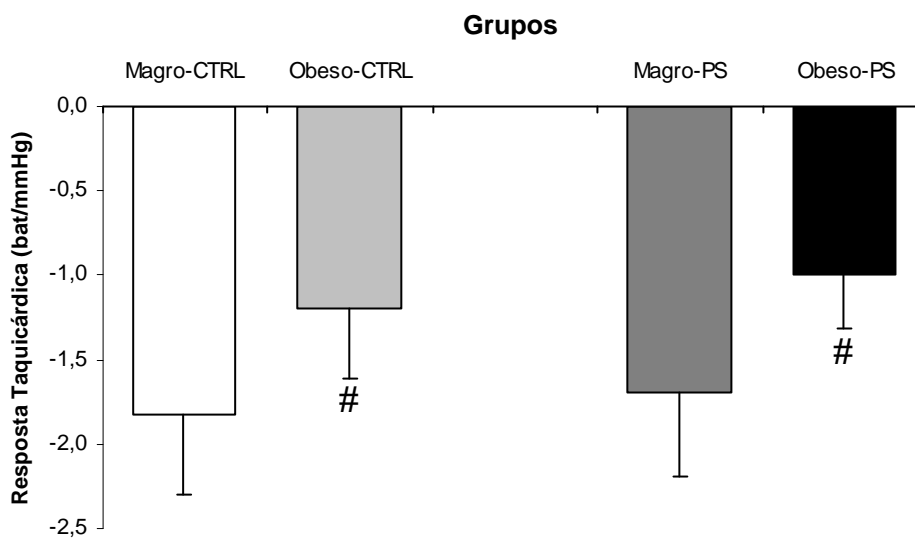
**A****B**

**Fig. 6** Valores de média  $\pm$  DP da pressão arterial média **(A)**, frequência cardíaca **(B)** em ratos Zucker machos CTRL (controle) e PS (privados de sono) em ratos de 6 meses de idade. \*Diferente do grupo controle; #Diferente do respectivo grupo magro.

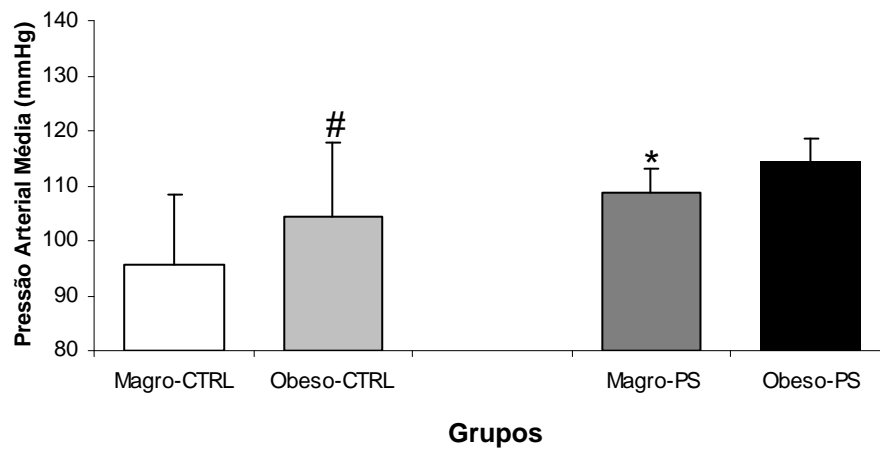
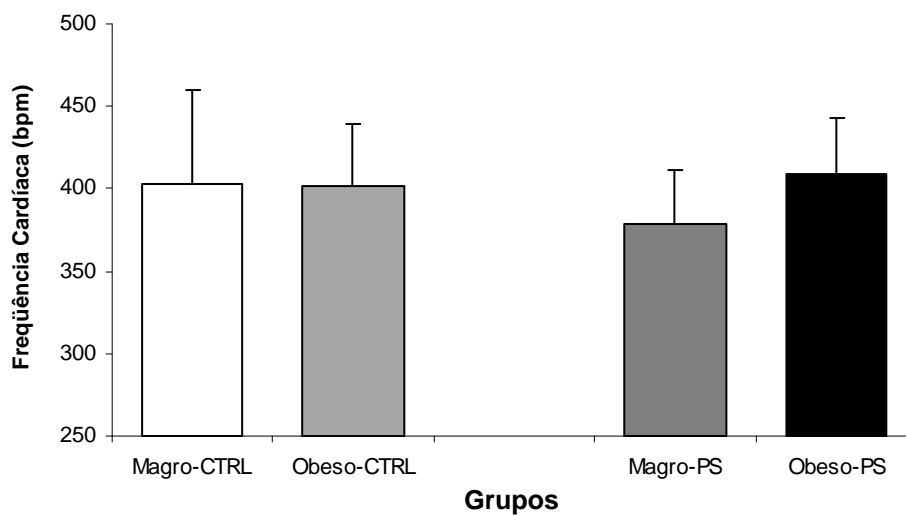
C



D

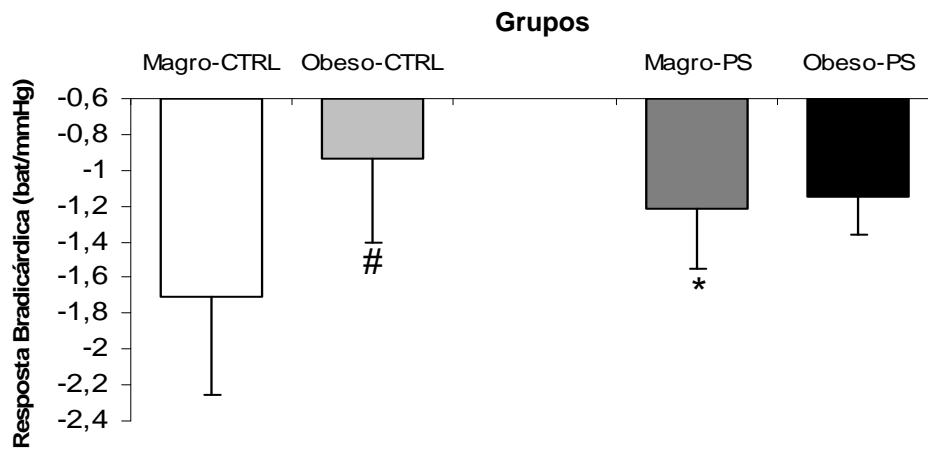


**Fig. 7** Valores de média  $\pm$  DP da resposta bradicárdica **(C)** e resposta taquicárdica **(D)** em ratos Zucker machos CTRL (controle) e PS (privados de sono) em ratos de 6 meses de idade. \*Diferente do grupo controle; #Diferente do respectivo grupo magro.

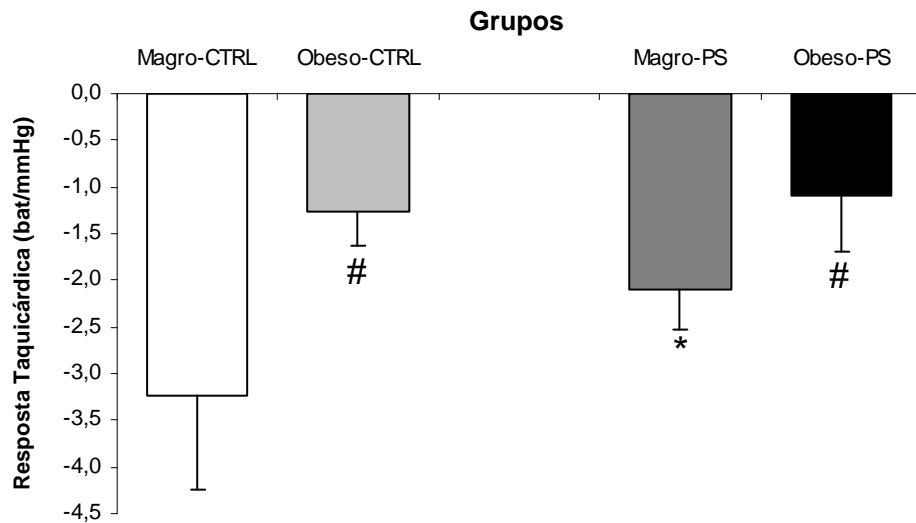
**A****B**

**Fig. 8** Valores de média  $\pm$  DP da pressão arterial média **(A)**, frequência cardíaca **(B)** em ratos Zucker machos CTRL (controle) e PS (privados de sono) em ratos de 12 meses de idade. \*Diferente do grupo controle; #Diferente do respectivo grupo magro.

C



D



**Fig. 9** Valores de média  $\pm$  DP da resposta bradicárdica **(C)** e resposta taquicárdica **(D)** em ratos Zucker machos CTRL (controle) e PS (privados de sono) em ratos de 12 meses de idade. \*Diferente do grupo controle; #Diferente do respectivo grupo magro.