XXX Congresso de Iniciação Científica UNICAMP

ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO E NOS NÍVEIS DE CORTICOSTERONA EM UM MODELO ANIMAL DA SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS.

Palavras-Chave: Sono, Síndrome das pernas inquietas, exercício físico.

Autores/as:
Larissa Moreira Dias [UNICAMP]
Beatriz Franco [UNICAMP]
Barbara Crisol [UNICAMP]
Isabela Divino [UNICAMP]
Eduardo Rochete Ropelle [UNICAMP]
Igor Luchini Baptista [UNICAMP]
Prof.ª Dr.ª Andrea Maculano Esteves [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

O sono possui uma série de funções e é crucial para manter nosso organismo funcionando de forma adequada. Uma vez que, o mesmo é prejudicado, causa desestabilização nas mais variadas partes do nosso organismo. A síndrome das Pernas Inquietas (SPI), é um distúrbio sensório-motor relacionado ao movimento de membros, principalmente inferiores, no período da tarde e noite quando o indivíduo está acordado, onde os sintomas são relatados como sensações de dor, queimação, coceira, entre o joelho e o tornozelo (Garcia-Borreguero, et al., 2006; Spolador, et al., 2006), sendo o exercício físico um tratamento não farmacológico para sintomas leves e moderados (Esteves, et al.. 2013; Franco, et al., 2019).

Além disso, classifica-se a SPI como primária e secundária. A SPI primária possui dois fenótipos com idades de início e componentes genéticos diferentes. O fenótipo com passagem hereditária (cerca de 40% dos casos) tendo início antes dos 30-35 anos de idade. Já a SPI secundária costuma ter início mais tardio, sendo frequente em pacientes com diabetes, uremia, deficiência de ferro (Aloé et al,. 2006), havendo outras condições como abuso de cafeína, fibromialgia, esclerodermia (Prado et al., 2002), mecanismos inflamatórios e imunológicos (Weinstock et al., 2012), gravidez (Alves et al., 2010), doença de Parkinson, ataxia espinocerebelar, machado joseph (Pedroso et al., 2011), síndrome pós-pólio (Marin et al., 2011), diabetes mellitus e outras (GBE-SPI 2007).

Tal desconforto físico e a necessidade de movimentação dos membros levam a fatores como a privação do sono, ou seja, dificuldade em manter o sono adequado e que passe por todas suas fases (Winkelman et al., 2009), acometidas pela insônia (Budhiraja et al., 2012) e despertares noturnos (Hornyak et al., 2007). Ainda, como consequência da privação do sono que a SPI traz, também danifica atividades diurnas e na qualidade de vida do indivíduo (Conti et al., 2007; Jones et al., 2012).

Vale ressaltar que, o distúrbio do sono SPI, está associado ao Movimentos Periódicos das Pernas (MPP), movimento no qual é recorrente em sua grande maioria nos membros inferiores, durante o sono NREM (Montplaisir et al., 1997; Walters 1995). Cerca de 88% das pessoas com SPI manifestam MPP, e ambos geram efeito negativo na qualidade do sono devido ao aumento da latência e no número de despertares (Allen et al., 2003).

Estudos científicos ainda não concluíram exatamente sobre o desenvolvimento da SPI sem passagem hereditária. Contudo, está relacionado a deficiência de ferro cerebral, como um mecanismo patogênico primário para a SPI (Earley et al., 2014). Estudos mostram que a alta prevalência da SPI, permeia em indivíduos com condições de insuficiência de ferro (Allen et al., 2013). Logo, esses indivíduos com o quadro de insuficiência de ferro, não apresentam deficiência sistêmica, sendo uma deficiência específica de ferro no cérebro.

Diversos estudos utilizam o modelo animal de deficiência de ferro para Síndrome das Pernas Inquietas. Os estudos recentes mostram alterações no sono dos animais, como aumento dos despertares e redução do tempo do sono de ondas lentas (Lai et al., 2017), alterações comportamentais (Qu et al., 2007; Mariano et al., 2014) e alterações nos sistemas dopaminérgico (Connor et al., 2009), glutamatérgico e adenosinérgico (Ferre et al., 2017).

Também, estudos mostram que a redução do sono, consequentemente a redução da qualidade do sono pode causar alterações de níveis de corticosterona e danos ao músculo esquelético, como atrofia, degeneração e

inflamação (Monico-Neto et al., 2021). As alterações no sono podem gerar redução das concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1), hormônio do crescimento (GH) e testosterona, além de aumentar as concentrações de glicocorticóides, como a corticosterona (Andersen et al., 2005). Todas essas alterações provocam um ambiente catabólico e pode ser um caminho das alterações musculares.

Anteriormente, pesquisas mostraram que os protocolos de privação do sono levam à atrofia muscular, mas em específico tal atrofia é dada nas fibras do tipo II, que têm um metabolismo predominantemente glicolítico, possivelmente devido à ação catabólica da corticosterona (Dattilo et al., 2012; Monico-Neto et al., 2015; Sa et al., 2016). No entanto, as fibras do tipo I, que têm um metabolismo predominantemente oxidativo, também podem surtir as consequências de um sono conturbado (Monito-Neto et al., 2015). I. Além disso, um estudo mostrou que em animais expostos a exercícios físicos de treinamento, por oito semanas antes da privação do sono por 96 h, resultou em aumento da concentração de corticosterona e refletiu em uma menor perda de massa corporal e redução da atrofia muscular (Monico-Neto et al., 2015).

Todavia, nada se sabe sobre as alterações musculares causadas pelas alterações do sono com a SPI. Portanto, hipotetizamos que a SPI que ocasiona a privação do sono, pode gerar aumento do estresse oxidativo nos músculos esqueléticos e causar danos em ambos os tipos de fibras. Além disso, o exercício físico pode agir como redutor dessas alterações causadas pela alteração no sono.

O presente estudo objetiva analisar alterações musculares em músculos estriado esquelético (sóleo e tibial anterior), como disposições de fibras tipo I e tipo II e quantidade e tamanho das fibras em um modelo animal com deficiência de ferro e com SPI.

METODOLOGIA:

Para a execução do projeto foram utilizados ratos Wistar e SHR com 21 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Todos os procedimentos foram submetidos à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (5255-1). Durante o período de estudo, os animais foram mantidos em salas climatizadas (média de 23ºC) com ciclo claro-escuro constante (12/12h), com ração e livre acesso à água, acondicionados em gaiolas com 4 animais. E, foram distribuídos conforme a tabela 1.

Grupos	Sedentário	Exercício físico
Dieta padrão	CTRL	CTRL EX
Dieta restrição de ferro	REST	REST EX

Tabela 1 *– Distribuição dos animais em seus respectivos grupos (Controle sedentário (dieta padrão) - CTRL; Controle Exercício físico (dieta padrão) - CTRL EX; Restrição de ferro sedentário (dieta restrição de ferro) - REST; Restrição de ferro exercício físico (dieta restrição de ferro) - REST EX).*

Delineamento Experimental: O experimento teve início aos 21 dias de vida (desmame) dos ratos Wistar. Ao completarem 35 dias de vida, todos os animais passaram a receber a dieta AIN93, no entanto os grupos controle (CTRL e CTRL EX) com uma concentração de ferro padrão (40mg/kg) e os grupos restrição de ferro (REST e REST EX) com uma concentração de ferro restrita (4mg/kg). Após 8 semanas de dieta específica, os animais dos grupos exercício físico passaram por 4 semanas de treinamento em esteira. Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico seguido de decapitação (CFMV, 2012) e amostras de tecidos coletadas para as análises (figura 1).

Procedimentos Experimentais

Dieta de ferro - A dieta foi produzida em parceria com o curso de Nutrição da FCA/Unicamp e feita a partir de ingredientes purificados, seguindo a composição das formulações da AIN93-M (Reeves, 1997). A dieta de restrição de ferro foi realizada manipulando o mix mineral de acordo com a % específica que as atendia, ajustando a composição geral do mix pelo veículo (sacarose). A concentração de ferro na dieta de restrição foi de 4mg/kg de ração. Os valores apresentados na AIN93-M correspondem às necessidades da dieta do roedor na fase adulta.

Exercício Físico- O exercício físico foi realizado em uma esteira (esteira para ratos – AVS Projetos). Antes do período experimental, a treinabilidade de cada rato foi analisada por meio de uma escala do tipo Likert (1 – 5), nos quais os ratos correram em esteira sem inclinação, a uma velocidade de 15 m/min, durante 5 min e por 6 dias consecutivos. Os animais com uma classificação média ≥ 3 foram incluídos no estudo de forma randomizada (Dishman, Armstrong, Delp, Graham, & Dunn, 1988). O protocolo de adaptação e treinamento foi realizado e adaptado de acordo com Arida, et al., (1999). Durante os 3 primeiros dias de adaptação, foi utilizado o estímulo elétrico e cada sessão de treinamento começou com 5 min de aquecimento a uma velocidade de 12–15 m/min, seguida por 30 min a 16 m/min. Após a adaptação, os animais foram submetidos a um teste de velocidade máxima,

para determinar a velocidade de corrida (Rabelo, et al., 2017). A velocidade utilizada no treinamento foi de 60% da velocidade de exaustão do teste. Todas as sessões, após o teste de carga incremental, consistiram em 5 min de aquecimento a uma velocidade de 10m/min seguidas por 55 minutos a 60% da velocidade de exaustão (a esteira foi mantida sempre sem inclinação). O programa consistiu em 5 sessões por semana, no horário entre 18 e 20h, durante 30 dias. O protocolo de adaptação e treino foi realizado da 9ª à 14ª semana de dieta (a partir da 12ª semana de vida).

Análises histológicas- Após a eutanásia, os músculos sóleo e tibial anterior das patas direitas dos animais foram retirados, pesados, divididos e congelados em isopentano e nitrogênio líquido. Os músculos foram cortados em seções transversais de 8µm de sua parte média, usando um criostato (CM1850, Leica®, Buffalo Grove, IL, EUA) a −24 ° C e aderidos às lâminas em cortes seriados. Posteriormente, os músculos foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) e modificados pela coloração com Gomoritricromo. As imagens foram adquiridas em microscópio de luz (Leica®). A área da seção transversal foi medida usando o software ImageJ (Research Services Branch, Instituto Nacional de Saúde Mental, Bethesda, MD, EUA), assim como exemplo na figura 2. As criosecções foram realizadas em cortes seriados e análises de hematoxilina e eosina foram adquiridas em cada seção para obter análise representativa dos músculos.Também, analisado o processo de degeneração dos tecidos e aumento da celularidade, sugerindo um processo inflamatório e atrofia muscular. A área da seção transversal da fibra muscular foi analisada de forma cega. As fibras musculares foram medidas usando o software AxioVision 4.6 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Essa variável foi avaliada em três animais de cada grupo e 5 imagens por amostra tecidual .

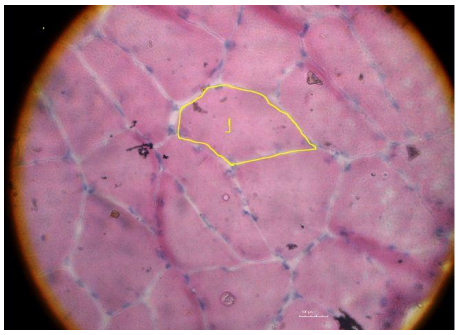

***Figura 2** – Amostra tecidual do tibial, para exemplificar funcionamento no ImageJ*

RESULTADOS:

As análises dos dados dos músculos sóleo e tibial anterior foram realizadas através do modelo linear univariado ($p<0,05$) utilizando como parâmetro de análise grupo, às dietas e o exercício. Na figura 4A estão dispostos os pesos dos músculos esquerdos dos animais. Encontramos diferença estatística no peso do músculo sóleo para a dieta ($F(1, 8)=7,96$, $p=0,02$),com redução quando os animais se alimentaram com a dieta restrição de ferro em relação à dieta padrão. Não foi encontrada diferença para grupo e exercício.

Analisamos as áreas de secção transversa das fibras e os diâmetro do músculo Sóleo (um²) e do músculo Tibial Anterior (figura 4B e 4C) e foi encontrada diferença entre os grupos no diâmetro do músculo sóleo ($F(3, 8)=4,58$, $p=0,03$), com redução no grupo REST em relação ao grupo CTRL ($p=0,04$). Quando analisada a influência da dieta e do protocolo de exercício físico, foi encontrada diferença estatística para a prática do exercício na área de secção transversal do músculo sóleo, com aumento da área com a prática do exercício em relação à não prática ($F(1, 8)=6,69$, $p=0,03$). E, na análise do diâmetro do sóleo, a dieta mostrou influência significativa ($F(1, 8)=6,26$, $p=0,03$), com redução para a dieta restrição de ferro em relação à dieta padrão de ferro.

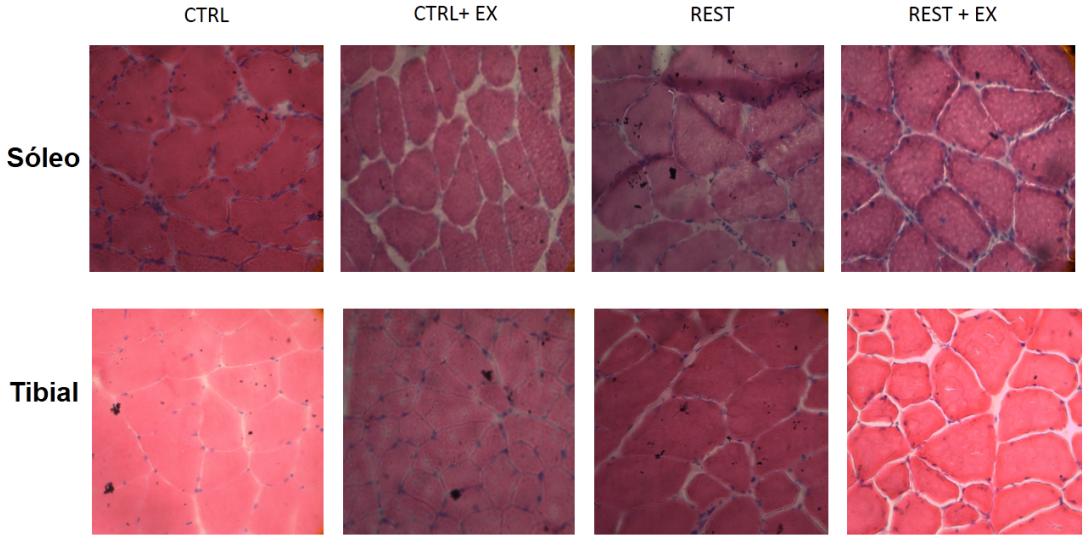

***Figura 3 –** Fotomicrografia dos músculos sóleo e tibial anterior. sóleo CTRL; sóleo CTRL EX; sóleo REST; sóleo REST EX; tibial anterior CTRL; tibial anterior CTRL EX; tibial anterior REST; tibial anterior REST EX; HE 40x.*

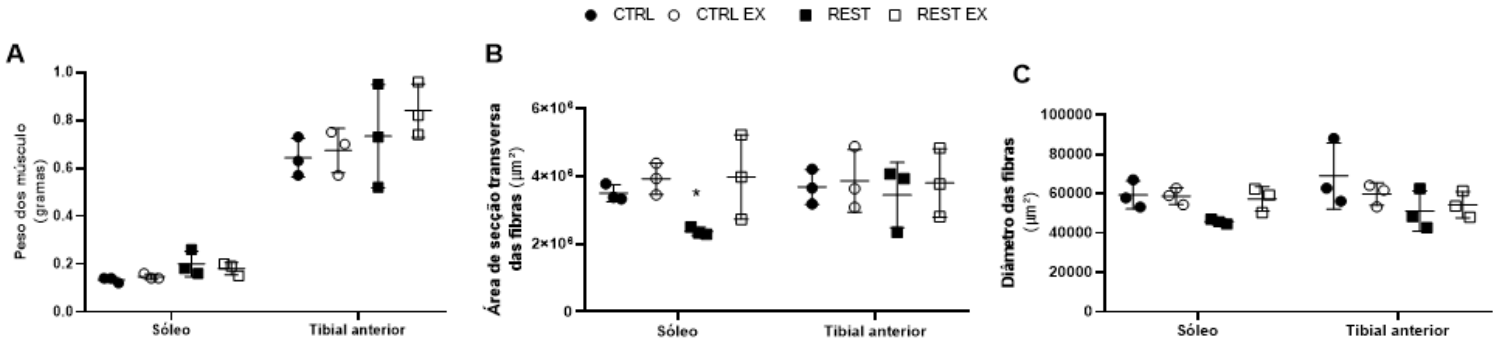

Figura 4 – (A) *Peso em gramas dos músculos sóleo e tibial anterior (pata esquerda*). ***(B)*** *Média das áreas de secção transversa das fibras do músculo Sóleo (um²) e do músculo Tibial Anterior (um²).* ***(C)*** *Média do diâmetro do músculo Sóleo (um²) e do músculo Tibial Anterior (um²). Dados apresentados em valores individuais, (n=3). Os dados foram analisados pelo Modelo linear univariado, com post hoc Tukey($p<0.05$). *Difere do grupo CTRL (sóleo).*

DISCUSSÃO:

O presente estudo revelou que possivelmente a dieta de restrição de ferro que gera alteração do sono ocasionou alterações histopatológicas de acordo com os tipos de fibras musculares. Uma vez que, o músculo sóleo é composto predominantemente por fibras do tipo I (fibras de contração lenta) e o músculo tibial é composto predominantemente por fibras do tipo II (fibras de contração rápida) (Lin, et al., 2002) somente o sóleo teve alteração em decorrência da dieta de restrição de ferro. A alteração histopatológica identificada foi diminuição do diâmetro do sóleo no grupo com restrição de ferro, podendo ter sido ocasionada por atrofia muscular e processo regenerativo. Além disso, é visto na literatura que a deficiência de ferro reduz a síntese de proteínas basais no músculo esquelético e prejudica o ganho, induzido pelo exercício, na contração muscular (Higashida, et al., 2021), logo tais alterações podem estar relacionadas a deficiência de ferro na dieta que induz a SPI.

Outrora, o exercício físico mostrou influência na área do músculo sóleo. Esse aumento provavelmente é um indicativo de que o treinamento foi capaz de controlar as mudanças. Ou seja, o exercício é capaz de diminuir impactos danosos pela dieta de restrição de ferro e sintomas da SPI no músculo esquelético.

Dessa forma, continuaremos mantendo como hipótese que a SPI aumenta o estresse oxidativo no músculo esquelético junto a restrição de ferro e causa danos em ambos os tipos de fibras, mesmo que ainda exibido nos resultados maior dano nas fibras do tipo I, assim como corresponde a privação de sono (Mônico-Neto, et al., 2021).Por fim, para darmos continuidade as análises estamos aumentando o n amostral da pesquisa e de forma adicional, realizando o procedimento de ATPase que diferencia os tipos de fibras (I e II).

CONCLUSÕES:

O grupo restrição de ferro (modelo para SPI) demonstrou atrofia muscular ou possível processo regenerativo apontado pelo diâmetro diminuído.

O treinamento do exercício físico em um modelo animal da síndrome das pernas inquietas com dieta restritiva do ferro foi capaz de controlar mudanças e danos no músculo esquelético sóleo. Mais estudos e análises são necessários para complementar o estudo e também aumento do n amostral.

BIBLIOGRAFIA

Arida, R. M., Scorza, F. A., dos Santos, N. F., Peres, C. A., Cavalheiro, E. A. 1999. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. Epilepsy Research, 37(1): 45-52.

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(1):83-90. doi: 10.1111/j.1365-2869.2004.00428.x.

Allen, R. P., Picchietti, D., Hening, W. A., Trenkwalder, C., Walters, A. S., Montplaisi, J. 2003. Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. Sleep Medicine, 4(2): 101-119.

Allen, R. P., Auerbach, S., Bahrain, H., Auerbach, M., Earley, C. J. 2013. The prevalence and impact of restless legs syndrome on patients with iron deficiency anemia. Am J Hematol, 88(4): 261-264.

Aloe, F., & Tavares, S. M. A. 2006. Síndrome das pernas inquietas. Revista Neurociências, 14(4), 204-213.

Alves DAG, Carvalho LBC, Morais JF, Prado GF. 2010. Restless legs syndrome during pregnancy in women. Sleep Med ;11:1049-54.

Connor, J. R., Wang, X. S., Allen, R. P., Beard, J. L., Wiesinger, J. A., Felt, B. T., Earley, C. J. 2009. Altered dopaminergic profile in the putamen and substantia nigra in restless leg syndrome. Brain, 132(Pt 9): 2403-2412.

Conti CF, Oliveira MM, Andriolo RB, Saconato H, Atallah AN, Valbuza JS, et al. 2007. Levodopa for idiopathic restless legs syndrome: Evidence-based review. Mov Disord ;22:1943-51.

DÁTTILO, M.; de Mello, MT. 2001. A privação de sono paradoxal em ratos está associada a atrofia muscular e déficit na recuperação muscular. Dissertação de mestrado; Pscicobiologia – EPM - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Dishman, R. K., Armstrong, R. B., Delp, M. D., Graham, R. E., Dunn, A. L. 1988. Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. Physiology & Behavior, 43(5): 541-546.

Earley, C. J., Connor, J., Garcia-Borreguero, D., Jenner, P., Winkelman, J., Zee, P. C., Allen, R. 2014. Altered brain iron homeostasis and dopaminergic function in Restless Legs Syndrome (Willis-Ekbom Disease). Sleep Med, 15(11): 1288-1301.

Budhiraja P, Budhiraja R, Goodwin JL, Allen RP, Newman AB, Koo BB, et al. 2012. Incidence of Restless Legs Syndrome and Its Correlates. J Clin. Sleep Med ;8:119-24.

Esteves, A. M., Lopes, C., Frussa-Filho, R., Frank, M. K., Cavagnolli, D., Arida, R. M., Tufik, S., de Mello, M. T. 2013. Spontaneously hypertensive rats: possible animal model of sleep-related movement disorders. J Mot Behav, 45(6): 487-493.

Ferre, S., Quiroz, C., Guitart, X., Rea, W., Seyedian, A., Moreno, E., Casado-Anguera, V., Diaz-Rios, M., Casado, V., Clemens, S., Allen, R. P., Earley, C. J., & Garcia-Borreguero, D. 2017. Pivotal Role of Adenosine Neurotransmission in Restless Legs Syndrome. Front Neurosci, 11: 722.

Franco, B.; Esteves, AM. 2019. Ferro e sua relação com distúrbios do movimento relacionados ao sono, comportamento, sistema dopaminérgico e exercício físico de proles wistar. Dissertação de mestrado; Faculdade de Educação Física (FEF) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Garcia-Borreguero, D., Egatz, R., Winkelmann, J., Berger, K. 2006. Epidemiology of restless legs syndrome: the current status. Sleep Med Rev, 10(3): 153-167.

Grupo Brasileiro de Estudos em Síndrome das Pernas Inquietas (GBE-SPI). 2007. Síndrome das pernas inquietas: diagnóstico e tratamento. Opinião de especialistas brasileiros. Arq Neuropsiquiatr; 65:721-7.

Higashida, K., Inoue, S., Takeuchi, N., Ato, S.,Ogasawara, R., Nakai, N.2021. Basal and resistance exercise- induced increase protein system imparaeid in skeletal muscle of iron-deficient rats. Nutrition, 111389.

Hornyak, M., Feige, B., Voderholzer, U., Philipsen, A., Riemann, D. 2007. Polysomnography findings in patients with restless legs syndrome and in healthy controls: a comparative observational study. Sleep, 30(7), 861-865.

Jones R, Cavanna AE. 2012. The neurobiology and treatment of RLS. Bahav Neurol ;25:1-10.

Kacawa, C. 2012. Action of antialdosterone compounds in the laboratory. In Hormonal Steroids Biochemistry, Pharmacology, and Therapeutics: Proceedings of the First International Congress on Hormonal Steroids. Elsevier. (p. 445).

Lai, Y. Y., Cheng, Y. H., Hsieh, K. C., Nguyen, D., Chew, K. T., Ramanathan, L., Siegel, J. M. 2017. Motor hyperactivity of the iron-deficient rat - an animal model of restless legs syndrome. Mov Disord, 32(12), 1687-1693. doi:10.1002/mds.27133

Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E. N., Lowell, B. B., Bassel-Duby, R. & Spiegelman, B. M. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature, 418, 797-801.

Mariano, M. O., Esteves, A. M., Frank, M. K., Caperuto, L. C., Manconi, M., Tufik, S., Mello, M. T. 2014. Changes in motor behavior during pregnancy in rats: the basis for a possible animal model of restless legs syndrome. Rev Bras Ginecol Obstet, 0: 0.

Marin LF, Carvalho LBC, Prado LBF, Quadros AAJ, Oliveira AS, 2011. Prado GF. Restless legs syndrome in post-polio syndrome: A series of 10 patients with demographic, clinical and laboratorial findings. Parkinsonism and Related Disorders ;17:563-564.

Mônico-Neto M, Lee KS, da Luz MHM, Pino JMV, Ribeiro DA, Cardoso CM, Sueur-Maluf LL, Tufik S, Antunes HKM. 2021. Histopathological changes and oxidative damage in type I and type II muscle fibers in rats undergoing paradoxical sleep deprivation. Cell Signal. ;81:109939. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.109939.

Montplaisir, J., Boucher, S., Poirier, G., Lavigne, G., Lapierre, O., & Lesperance, P. 1997. Clinical, polysomnographic, and genetic characteristics of restless legs syndrome: a study of 133 patients diagnosed with new standard criteria. Mov Disord, 12(1): 61-65.

Prado GF, Allen RP, Trevisani VMF, Toscano VG, Earley CJ. 2002. Sleep disruption in systematic sclerosis (scleroderma) patients: clinical and polysomnographic findings. Sleep Med ;3:341-5.

Pedroso JC, Braga-Neto P, Felicio AC, Aquino CCH, Prado LBF, Prado GF, et al. 2011. Sleep Disorders in Cerebellar Ataxias. Arq Neuropsiquiatr ;69:253-7.

Pedroso JL, Braga-Neto P, Felicio AC, Dutra LA, Santos WAC, Prado GF, et al. 2011. Sleep Disorders in Machado–Joseph Disease: Frequency, Discriminative Thresholds, Predictive Values, and Correlation with Ataxia-Related Motor and Non-Motor Features. Cerebellum ;10:291-5.

Rabelo, P. C., Almeida, T. F., Guimarães, J. B., Barcellos, L. A., Cordeiro, L. M., Moraes, M. M., Coimbra, C. C., Szawka, R. E., Soares, D. D. 2015. Intrinsic exercise capacity is related to differential monoaminergic activity in the rat forebrain. Brain Research Bulletin, 112: 7-13.

Rabelo, P. C. R., Horta, N. A. C., Cordeiro, L. M. S., Spolador, T., Allis, J. C., Ponde, M. P. 2006. Treatment of restless legs syndrome. Rev Bras Psiquiatr, 28(4): 308-315.

Walters, A. S. 1995. Toward a better definition of the restless legs syndrome. The International Restless Legs Syndrome Study Group. Mov Disord, 10(5): 634-642.

Weinstock LB, Walters AS, Paueksakon P. 2012. Restless legs syndrome and Theoretical roles of inflammatory and immune mechanisms. Sleep Med Rev; 16:341-54.

Winkelman JW, Redline S, Baldwin CM, Resnick HE, Newman AB, Gottlieb DJ. 2009. Polysomnographic and Health-related Quality of Life Correlates of Restless Legs Syndrome in the Sleep Heart Health Study. Sleep. 32:772-8.