



## SONO, COMPORTAMENTO E PARÂMETROS MOLECULARES DE UM MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS.

**Palavras-Chave:** SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS, MODELO ANIMAL, SONO.

**Autores/as:**

LARISSA MOREIRA DIAS, FCA, UNICAMP.

VANDERSON DOUGLAS ROCHA, FCA, UNICAMP.

BEATRIZ FRANCO, FEF, UNICAMP.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ADRIANA TORSONI, FCA, UNICAMP.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ANDREA MACULANO ESTEVES, FCA, UNICAMP.

### INTRODUÇÃO:

O sono possui uma série de funções e é fundamental para manter nosso organismo funcionando de forma adequada, sendo um estado vital e complexo descrito por processos organizados (Roeths et al., 2000) que correspondem a sua intensidade e presença de marcadores eletrofisiológicos (Rechtschaffen et al., 1968). A privação do sono é a remoção ou instabilidade do sono (Chen et al., 2005) uma vez que quando o mesmo é prejudicado, pode ocasionar inúmeras alterações nas mais variadas partes do nosso organismo, sendo: endócrinas, metabólicas, físicas, cognitivas, neurais e alterações na estruturação do sono, que em conjunto comprometem a saúde e a qualidade de vida do sujeito neste quadro (Spiege et al., 1999; Bonnet et al., 2003; Shephard et al., 1997). Ademais, como um dos distúrbios do sono, encontra-se a Síndrome das Pernas Inquietas.

A Síndrome das Pernas Inquietas (SPI), é um distúrbio sensorio-motor, e os sintomas são relatados como sensações de dor, queimação, coceira, principalmente dos membros inferiores, entre o joelho e o tornozelo e no período da tarde e noite quando o indivíduo está acordado (Garcia-Borreguero et al., 2006; Spolador et al., 2006). Tal desconforto físico é caracterizado pela necessidade de movimentação dos membros, que levam a fatores como a privação do sono, ou seja, dificuldade em manter o sono (Winkelman et al., 2009), acometidos 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, a qualidade de vida do indivíduo e alterações no Sistema Nervoso Central (Conti et al., 2007; Jones et al., 2012).

Além disso, classifica-se a SPI como primária e secundária. A primária é com passagem hereditária (cerca de 40% dos casos) e tem início antes dos 30-35 anos de idade (Aloé et al., 2006). Já a SPI secundária costuma ter início mais tardio, sendo frequente principalmente em pacientes com deficiência de ferro (Aloé et al., 2006) e uremia, 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, Síndrome Machado Joseph (Pedroso et al., 2011), Síndrome pós-pólio (Marin et al., 2011), diabetes mellitus e outras (GBE-SPI 2007).

Nesse ínterim, estudos científicos ainda não concluíram exatamente sobre o desenvolvimento da SPI sem passagem hereditária. Contudo, é bem demonstrada a relação com a deficiência de ferro cerebral, como um mecanismo patogênico primário para a SPI (Earley et al., 2014).

Ademais, 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 vista pelo aumento na atividade locomotora (Qu et al., 2007; Mariano et al., 2014) e alterações nos sistemas dopaminérgico (Connor et al., 2009), glutamatérgico e adenosinérgico (Ferre et al., 2017). Além da deficiência de ferro cerebral, estudos mostram que pacientes com SPI apresentam alterações na via da hipóxia, no sistema glutamatérgico e no sistema adenosinérgico. Todavia, ainda não é completamente dominado as disfunções dos sistemas de dopamina e adenosina na patologia da SPI.

Por conseguinte, a adenosina e sua regulação pode estar diretamente comprometida entre os mecanismos da dopamina e do glutamato, mas nada se sabe firmemente, pois é desconhecido na literatura sobre essa relação, principalmente em modelos animais com SPI. No entanto, nada se é dominado sobre as disfunções moleculares (dopaminérgica e adenosinérgica) e comportamentais, devido ao aumento de locomoção, relacionadas com a patologia da SPI, interligadas com as alterações do sono.

Por fim, modelos animais experimentais possibilitam que sejam realizadas análises de amostras biológicas contribuindo com a elucidação dos mecanismos etiopatogênicos para o avanço das pesquisas (Pereira et al., 2012). Além disso, nosso grupo vem realizando estudos em modelos para SPI em ratos desde 2001 (Esteves et al., 2004; Ferreira et al., 2007; Frank et al., 2012;

Esteves et al., 2013; Lopes et al., 2012; Moraes et al., 2020; Franco et al., 2021). No entanto, de um tempo mais recente pra cá, vem crescendo o número de pesquisas em camundongos para SPI, assim acreditamos ser importante iniciar os estudos desse distúrbio em camundongos no nosso laboratório a fim de, cada vez mais, desenvolver novas técnicas, análises e modelos, e aumentar o aspecto translacional nas nossas pesquisas. Assim, o objetivo do presente estudo é a padronização do modelo experimental em camundongos de deficiência de ferro da SPI para futuras pesquisas sobre no Laboratório de Sono e Exercício Físico (LASEF), abrindo possibilidades de novos ramos a serem estudados na ciência em prol da saúde e bem-estar futuro dos indivíduos.

## METODOLOGIA:

Para a execução do projeto foram utilizados camundongos machos C57BL/6J com 28 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (6013-1/2022). Durante o período de estudo, os animais foram mantidos em salas climatizadas (média de 23°C) com ciclo claro-escuro constante (12/12h), com ração e livre acesso à água, acondicionados em gaiolas com 3 ou 4 animais. Os animais foram distribuídos em:

- Controle (dieta padrão) - CTRL (n=10);
- Deficiência de ferro (dieta restrição de ferro) - DFe (n=10);

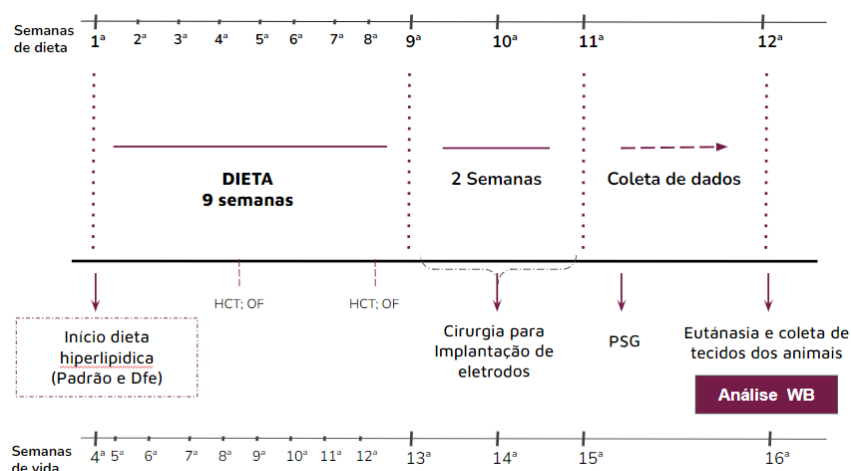


Figura 1 – Delineamento experimental. Deficiência de ferro; OF: PSG; Polissonografia; WB: Western Blotting; HCT: Hematócrito.

**Delineamento experimental:** A distribuição foi feita de modo aleatório e a dieta para caracterização do modelo animal iniciou-se na 4ª semana de vida. Após isso, na 4ª e 8ª semana de dieta, foram realizados os testes, comportamental Open Field (Manconi et al., 2007) e o hematócrito, assim como descritos na figura 1. Todos os procedimentos foram submetidos à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (6013-1). Durante o período de estudo, os animais foram mantidos em salas climatizadas (média de 23°C) com ciclo claro-escuro constante (12/12h), com ração e livre acesso à água, acondicionados em gaiolas com 4 animais.

Com 90 dias de vida, foi realizada a cirurgia de implantação de eletrodos, e após 7 dias de recuperação foi realizado um registro do sono de 24h. Ao final dos experimentos (após 12 semanas de dieta) foi realizada a eutanásia e extraído o estriado dos animais para análises moleculares do sistema dopaminérgico (receptor D2 e transportador de dopamina).

### 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 quantidade específica que as atendia. 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. A dieta foi iniciada após o desmame dos animais com 28 dias de vida e teve a duração de 12 semanas.

**Análise do hematócrito-** Ao longo dos experimentos (5ª e 8ª semana de dieta) os níveis de hematócrito foram analisados no sangue dos animais (caudal) para controle do efeito da dieta com alterações de ferro. A coleta foi realizada em capilares, que foram centrifugados por 5 min a 3500 rpm. Após a centrifugação, os níveis de hematócritos foram calculados medindo o comprimento da camada de glóbulos vermelhos em relação ao conteúdo total coletado.

**Inserção de eletrodo e Registro do ciclo vigília-sono (Polissonografia)-** Para registro da atividade eletrocorticográfica (ECoG) dos animais, primeiramente foi realizada uma cirurgia estereotáxica para a implantação de eletrodos (Timo-Laria et al., 1970). Foi realizado um aprofundamento anestésico inalatório por isoflurano e após se deu início à cirurgia. Para o registro da atividade elétrica cortical dos animais, com o intuito de caracterizar e quantificar o sono e suas respectivas fases (vigília, sono de ondas lentas e sono paradoxal), foi feito a inserção de um par sob a superfície cortical, de localização rostral, para o registro do ECoG (1- 1,5 mm anterior ao *bregma* e 2 mm à direita da sutura sagital; 2- 3mm inferior ao *bregma* e 2 mm à direita da sutura sagital). Também foram implantados dois fios no músculo tibial anterior (pata traseira), possibilitando assim o registro eletromiográfico, necessário para a caracterização dos movimentos das patas durante o sono. Com 90 dias de vida foi realizada a cirurgia de implantação de eletrodos, e o registro do sono de 24 horas foi realizado ao final do experimento, após 7 dias de

recuperação. Foram analisados os parâmetros de sono REM, Sono de Ondas Lentas (SOL), Vigília, Eficiência do Sono, Despertares, Tempo Total do Sono e Movimento das Patas.

**Western Blotting-** A técnica de Western Blotting foi realizada seguindo o protocolo de Kurien e Scofield (Kurien & Scofield, 2003) adaptado. Fragmentos do estriado (caudado e putâmen) foram coletados para avaliação de proteínas específicas. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de extração a 4 ° C. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 rpm durante 30 minutos para remover o material insolúvel. O reagente de Bradford foi utilizado para determinar a concentração de proteínas das amostras e depois foi colocado em tampão de Laemmli contendo DTT. Para a análise de imunotransferência, uma quantidade de 30µg de proteínas foi separada em SDS-PAGE e transferida para uma membrana de nitrocelulose, com o auxílio do aparelho Mini-gel Bio-Rad. As membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos (receptor de transferrina, receptor de dopamina D2 e transportador de dopamina, utilizando como controle endógeno Tubulina). Após o período de incubação, os anticorpos foram removidos. Então, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário. Após a lavagem, as membranas foram incubadas na solução de revelador Super Signal (Thermo Scientific) e colocadas no fotodocumentador GeneGnomeXRQ-Syngene. O sinal foi detectado por quimioluminescência. A intensidade das bandas foram avaliadas por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os dados do Hematócrito realizados na 8ª semana de dieta (figura 2), do registro do sono, das 6-18 horas do período claro, (figura 3) e do conteúdo proteico (Western blotting) do D2, DAT e Tr-R (figura 4) foram analisados pelo Teste T, com  $p < 0,05$ . Além disso, os parâmetros do sono foram analisados por correlação de Pearson. O grupo DFe apresentou redução da eficiência do sono ( $p = 0,003$ ) e do tempo de sono de ondas lentas ( $p = 0,014$ ) e REM ( $p = 0,026$ ) e aumento de movimentos das patas ( $p = 0,027$ ) e tempo de vigília ( $p = 0,004$ ) em relação ao grupo CTRL.

Nas análises do WB, o grupo DFe apresentou redução dos níveis proteicos de D2-R ( $p = 0,002$ ), DAT ( $p = 0,005$ ) e Tr-R ( $p = 0,027$ ) quando comparados ao grupo CTRL.

Além disso, foi encontrada (figura 5) correlação positiva entre DAT e Tr-R ( $r = 1, p < 0,000$ ) e correlação negativa dos movimentos das patas com o tempo total de sono ( $r = -0,88, p = 0,020$ ), com a eficiência do sono ( $r = -0,87, p = 0,023$ ) e com o tempo de sono de ondas lentas ( $r = 0,89, p = 0,015$ ).

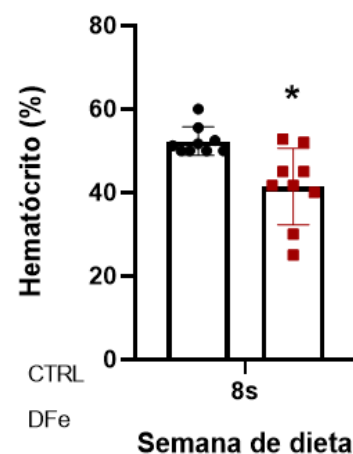


Figura 2. Hematócrito (8ª Semana de dieta); (n=9).

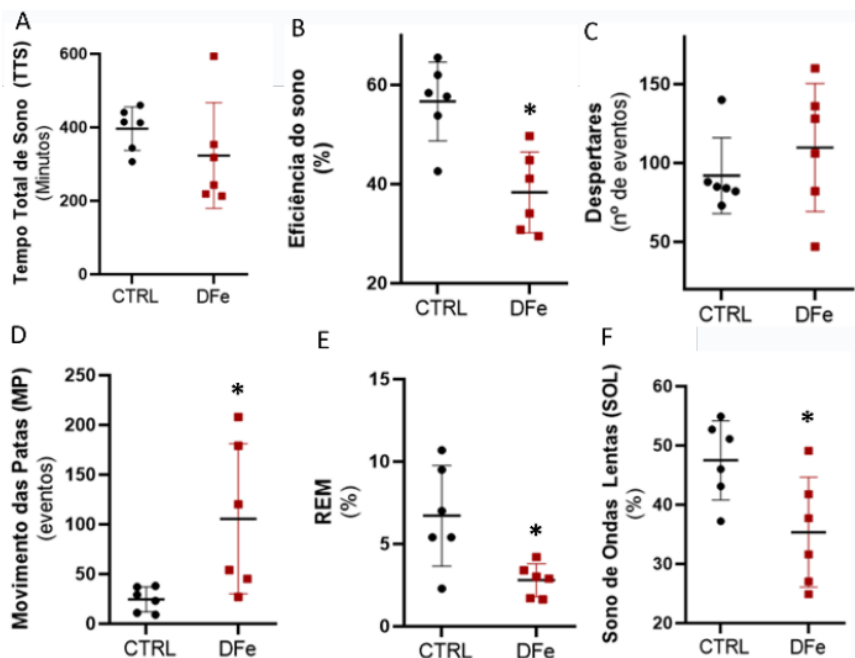
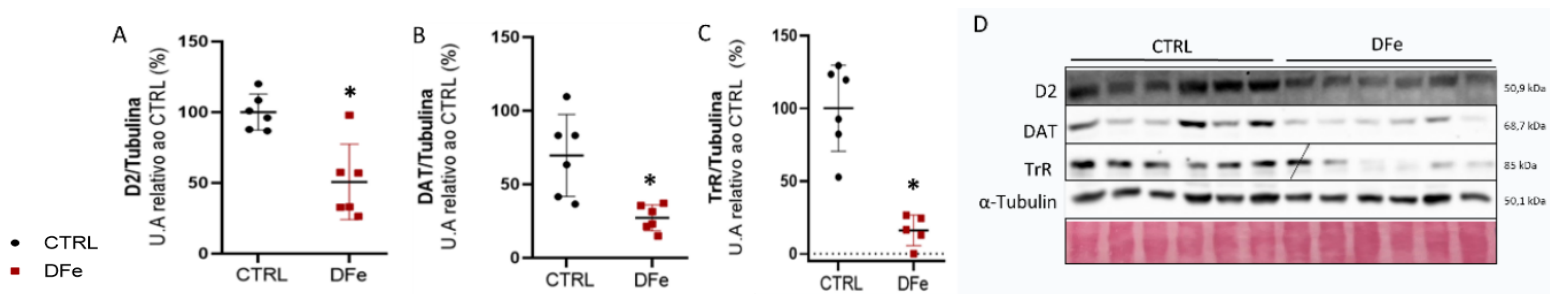
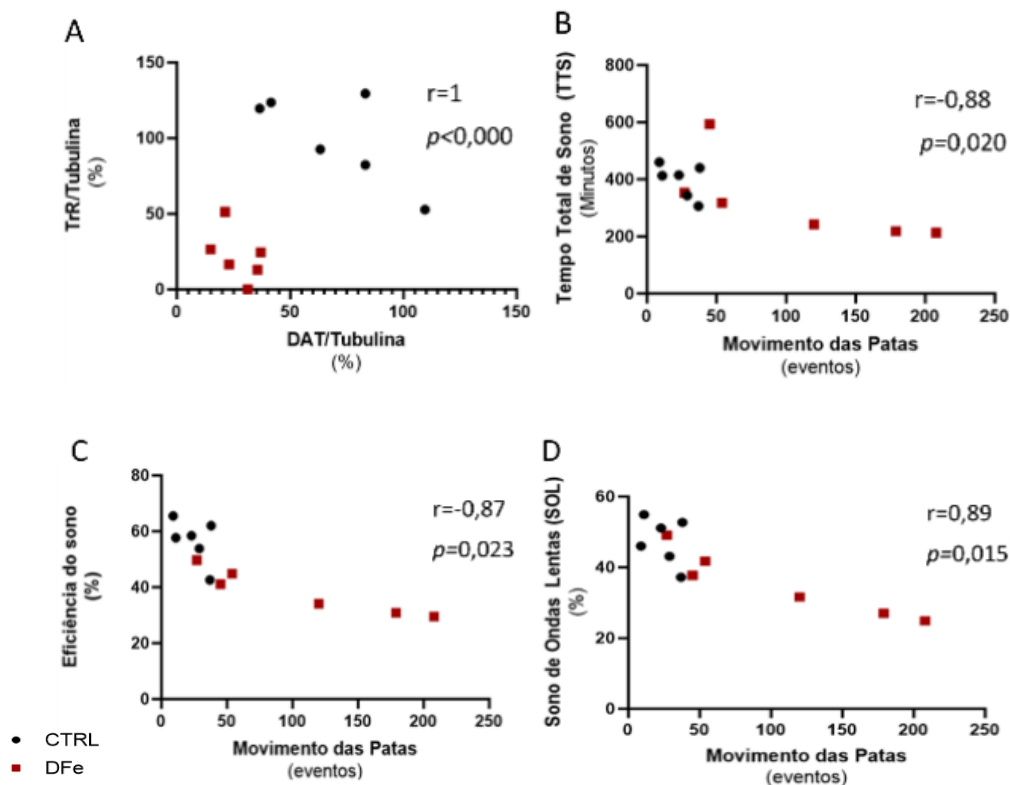


Figura 3. Registro do sono (6-18 horas) realizado na 11ª semana de dieta. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvios-padrão, (n=6).  $p < 0,05$ \*



**Figura 4.** Quantificação do conteúdo proteico (Western Blot). (A) D2/Tubulina; (B) DAT/Tubulina; (C) TrR/Tubulina; (D) Membranas. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvios-padrão, (n=6).  $p < 0.05^*$



**Figura 5.** Correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ) entre: (A) Receptor de transferrina e DAT; (B) TTS e MP; (C) Eficiência do sono e MP; (D) SOL e MP; (n=6).

Tais achados revelam que, a Síndrome das Pernas Inquietas ocasiona em nosso modelo animal, distúrbios no sistema dopaminérgico, sendo diminuído o conteúdo de receptores dopaminérgicos (D2 e DAT) no grupo que apresenta deficiência de ferro. Também, nota-se no grupo DFe que houve diminuição no receptor de transferrina, no qual é sintetizado conforme a regulação dos níveis de ferro.

Dessa forma, o nosso grupo CTRL manteve-se em estados ideais tanto dos parâmetros moleculares quanto dos parâmetros das variáveis do sono. Contudo, o grupo DFe também trouxe um perfil de alteração de sono, sendo reduzida a eficiência do sono, o tempo de sono de ondas lentas e REM e ainda houve aumento de movimentos das patas e tempo de vigília. Além disso, o aumento de movimentos das patas proporcionou um estado negativo a permanência sono, levando a diminuição da eficiência do sono, sono de ondas lentas e tempo total do sono

## CONCLUSÕES:

O nosso modelo de camundongo com deficiência de ferro para a Síndrome das Pernas Inquietas (SPI), trouxe características como, redução dos níveis proteicos de receptor de dopamina (D2 e DAT) e receptor de transferrina, redução da eficiência do sono, do tempo de sono de ondas lentas, do sono REM, assim como aumento de movimentos das patas e tempo de vigília. Por fim, tais características são consistentes com os estudos e com os sintomas desse distúrbio do sono avaliado.

Processo FAPESP: 2022/07009-2.

## BIBLIOGRAFIA

- Aloe, F., & Tavares, S. M. A. Síndrome das pernas inquietas. **Rev Neurociênc.** 14(4), 204-213, 2006.
- Alves, D.A.G., Carvalho, L.B.C., Morais, J.F., Prado, G.F. Restless legs syndrome during pregnancy in women. **Sleep Med.** 11:1049-54, 2010.
- Bonnet, M.H., Arand, D.L. Clinical effects of sleep fragmentation versus sleep deprivation. **Sleep Med Rev.** 7: 297-310, 2003.
- Budhiraja, P., Budhiraja, R., Goodwin, J.L., Allen, R.P., Newman, A.B., Koo, B.B. Incidence of Restless Legs Syndrome and Its Correlates. **J Clin. Sleep Med.** 8:119-24, 2012.
- Connor, J. R., Wang X. S., Allen R. P., Beard J. L., Wiesinger J. A., Felt B. T., Earley C. J. Altered dopaminergic profile in the putamen and substantia nigra in restless leg syndrome. **Brain.** 132(Pt 9): 2403-2412, 2009.
- Earley, C. J., Connor, J., Garcia-Borreguero, D., Jenner, P., Winkelman, J., Zee, P. C., Allen, R. Altered brain iron homeostasis and dopaminergic function in Restless Legs Syndrome (Willis-Ekbom Disease). **Sleep Med.** 15(11): 1288-1301, 2014.
- Esteves, A.M., de Mello, M.T., Lancellotti, C. L. P., NATAL, C. L., Tufik, S. Occurrence of limb movement during sleep in rats with spinal cord injury. **Brain Res.** v. 1017, p. 32-38, 2004.
- Esteves, A. M., Lopes, C., Frussa-Filho, R., Frank, M. K., Cavagnolli, D., Arida, R. M., Tufik, S., de Mello, M. T. Spontaneously hypertensive rats: possible animal model of sleep-related movement disorders. **J Mot Behav.** 45(6): 487-493, 2013.
- 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. Pivotal Role of Adenosine Neurotransmission in Restless Legs Syndrome. **Front Neurosci.** 11: 722, 2017.
- Ferreira, J.C., Rolim, N.P., Bartholomeu, J.B., Gobatto, C.A., Kokubun, E., Brum, P.C. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** Aug;34(8):760-5, 2007.
- Frank, M.K., Esteves, A.M., Lopes, C., Cavagnolli, D., Tufik, S., de Mello, M.T. The Effects of Physical Exercise on the Serum Iron Profile in Spontaneously Hypertensive Rats. **Biol Trace Elem Res.** v. 145, p. 222-224, 2012.
- Garcia-Borreguero, D., Egeatz, R., Winkelmann, J., Berger, K. Epidemiology of restless legs syndrome: the current status. **Sleep Med Rev.** 10(3): 153-167, 2006.
- Hornyak, M., Feige, B., Voderholzer, U., Philipsen, A., Riemann, D. Polysomnography findings in patients with restless legs syndrome and in healthy controls: a comparative observational study. **Sleep.** 30(7), 861-865, 2007.
- Jones, R., Cavanna, A.E. The neurobiology and treatment of RLS. **Bahav Neurol.** 25:1-10, 2012.
- Lai, Y. Y., Cheng, Y. H., Hsieh, K. C., Nguyen, D., Chew, K. T., Ramanathan, L., & Siegel, J. M. Motor hyperactivity of the iron-deficient rat - an animal model of restless legs syndrome. **Mov Disord.** 32(12), 1687-1693, 2017.
- Lopes, C., Esteves, A.M., Frussa-Filho, R., Tufik, S., de Mello, M.T. Evaluation of Periodic Limb Movements in a Putative Animal Model of Restless Leg Syndrome. **Mov Disord.** v. 27, p. 413-420, 2012.
- Manconi, M., Hutchins, W., Feroah, T. R., Zucconi, M., & Ferini-Strambi, L. On the pathway of an animal model for restless legs syndrome. **Neurol Sci.** 28(1), S53-S60, 2007.
- Mariano, M. O., Esteves, A. M., Frank, M. K., Caperuto, L. C., Manconi, M., Tufik, S., Mello, M. T. 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, 2014.
- Marin, L.F., Carvalho, L.B.C., Prado, L.B.F., Quadros, A.A.J., Oliveira, A.S., Prado, G.F. Restless legs syndrome in post-polio syndrome: A series of 10 patients with demographic, clinical and laboratorial findings. **Parkinsonism Relat Disord.** 17:563-564, 2011.
- Morais, M.A., Franco, B., Holanda, A. S., Manconi, M., Torsoni, A.S., Esteves, A.M. PTPRD is as a candidate druggable target for therapies for Restless Legs Syndrome?. **J Sleep Res.** v. 30, p. e13216, 2020.
- Pedroso, J.C., Braga-Neto, P., Felicio, A.C., Aquino, C.C.H., Prado, L.B.F., Prado, G.F. Sleep Disorders in Cerebellar Ataxias. **Arq Neuropsiquiatr.** 69:253-7, 2011.
- Pedroso, J.L., Braga-Neto, P., Felicio, A.C., Dutra, L.A., Santos, W.A.C., Prado, G.F. 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, 2011.
- Pereira, D. T. S., Lima-Ribeiro, M.H.M., Pontes-Filho, T.N., Carneiro-Leão, A.M.A., Correia, S.T.M. Development of animal model for studying deep second-degree thermal burns. **J Biomed Biotechnol.** v. 2012, p. 460841, 2012.
- Qu, S., Le, W., Zhang, X., Xie, W., Zhang, A., Ondo, W.G. Locomotion is enhanced in iron-deprived A11-lesioned mice: a possible model for restless legs syndrome. **J Neuropathol Exp Neurol.** 66:383-8, 2007.
- Reeves, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr.** 127(5 Suppl): 838S-841S, 1997.
- Roeths, T., Roth T. Sleep-wake state and memory function. **Sleep.** 23: S64-8, 2000.
- Shephard, R.J., Shek, P.N. Interactions between sleep, other body rhythms, immune responses, and exercise. **Can J Appl Physiol.** 22: 95-116, 1997.
- Spolador, T., Allis, J. C., Ponde, M. P. Treatment of restless legs syndrome. **Rev Bras Psiquiatr.** 28(4): 308-315, 2006.
- Weinstock, L.B., Walters, A.S., Pauksakon, P. Restless legs syndrome and Theoretical roles of inflammatory and immune mechanisms. **Sleep Med Rev.** 16:341-54, 2012.
- Winkelman, J.W., Redline, S., Baldwin, C.M., Resnick, H.E., Newman, A.B., Gottlieb, D.J. Polysomnographic and Health-related Quality of Life Correlates of Restless Legs Syndrome in the Sleep Heart Health Study. **Sleep.** 32:772-8, 2009.