

TATHIANA APARECIDA FERNANDES ALVARENGA

**EFEITO DA PRIVAÇÃO E RESTRIÇÃO DE SONO NA
FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo

2011

TATHIANA APARECIDA FERNANDES ALVARENGA

**EFEITO DA PRIVAÇÃO E RESTRIÇÃO DE SONO NA
FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientadora:

Profa. Dra. Monica Levy Andersen

Co-orientador:

Prof. Dr. Sergio Tufik

São Paulo

2011

Alvarenga, Tathiana Aparecida Fernandes

Efeito da Privação e Restrição de Sono na Função Reprodutiva de Ratos Machos – Tathiana Aparecida Fernandes de Alvarenga – São Paulo, 2011.

xx, 111f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Effects of sleep loss on reproductive function of male rats

1. Privação de sono; 2. Restrição de sono; 3. Espermograma;
4. Comportamento sexual; 5. Hormônios; 6. Ratos.

TATHIANA APARECIDA FERNANDES DE ALVARENGA

**EFEITO DA PRIVAÇÃO E RESTRIÇÃO DE SONO NA
FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo-Franci

Profa. Dra. Carmita Helena Najjar Abdo

Prof. Dr. Roberto Frussa-Filho

SUPLENTES

Profa. Dra. Renata Mazaro-Costa

Prof. Dr. Luciano Felício

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA**

Chefe do Departamento:

Profa. Dra. Maria Lúcia Oliveira de Souza Formigoni

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

Esta tese de doutorado foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo, no período de maio/2009 a maio/2011, com apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 09/14206-4, 09/01030-5 e 98/14303-3 (CEPID).

...Viva!

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é "muito" pra ser insignificante...

Charles Chaplin

Dedico esta tese

*Aos meus pais, **Sueli Aparecida Fernandes e Luiz Antônio de Alvarenga**, sinônimos de força e garra. Com isso me ensinaram a seguir em frente e a traçar os caminhos para alcançar meus objetivos da melhor forma possível.*

*Ao meu irmão, **Thiago Manoel Fernandes de Alvarenga**, por estar sempre ao meu lado, torcendo e acreditando em tudo que faço.*

“Agradeço a eles pelo amor, carinho e compreensão que muitas vezes foram transmitidos apenas por um olhar. Cumplicidade e amor eterno”

MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus orientadores

Monica Levy Andersen, pela confiança e respeito, por todos os desafios impostos e pela convivência durante estes anos. Um período suficiente para estabelecer uma relação de incentivo, cooperação, e amizade dentro e fora da vida acadêmica.

Sergio Tufik, pelo respaldo, compreensão e ensinamentos prestados durante toda a realização deste projeto. Pela sua enorme capacidade de ensinar e de expressar sua generosidade e respeito com o próximo.

“Obrigada por compartilharem comigo a seriedade, motivação, entusiasmo e brilhantismo presentes em tudo o que fazem. Com certeza, isso foi muito importante para o meu crescimento profissional e pessoal”.

"Sucesso não é a chave para a felicidade; felicidade é a chave para o sucesso. Se você ama o que faz, você será bem sucedido."

Albert Schweitzer

Às minhas amigas e irmãs científicas:

Juliana Cini Perry, pela amizade, pela sinceridade e pelo companheirismo em todos os momentos. Exemplo de otimismo, amizade e de profissionalismo.

Renata Mazaro-Costa, pelas longas madrugadas de experimentos e discussões sobre comportamento sexual que nos renderam muitas risadas...

“Um amigo é uma pessoa com a qual se pode
pensar em voz alta”

Ralph Waldo Emerson

AGRADECIMENTOS

À **minha família**, pelo carinho e apoio, e pela compreensão quando eu não pude estar presente.

A todos os **professores do curso de Pós-Graduação do Departamento de Psicobiologia**, pelas importantes contribuições para minha formação acadêmica.

Aos colegas de trabalho, **Camila Hirotsu, Fernanda Armani, Flávia Egydio, Gabriel Pires, Gabriela Pimenta, Marina Aguiar, Paulinha Araujo e Neuli Tenório**. Em especial, **Bruno Calegare, Francielli Ruiz, Ligia Papale e Vanessa Kahan**, pela ajuda e amizade de sempre!

Meus sinceros agradecimentos a **todos os alunos**, em especial **Bruno de Brito, Juliana Carlota, Juliane Borges, Karina Abrahão, funcionários e técnicos do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP**. Obrigada pelo convívio sempre agradável e o bom dia de todas as manhãs.

Aos amigos **Daniel Paulino, Darine Villela e Vanessas Cassoni**, por todo o incentivo, convívio e alegrias desde a Graduação. Em especial a **Isabela Antunes** por ter me apresentado ao Departamento de Psicobiologia.

Aos amigos **Alessandra Arce, Andréa Rodrigues, Amanda Castro, Caio Carvalho, Daniela Mendes, Janina Stamato, Júlio César da Silva, Natália Pupo, Priscila Lanzilota e Sidney Fernandes**, por me apoiarem sempre, mesmo não entendendo todos os aspectos do meu projeto.

Às minhas amigas e irmãs de coração **Adriana Teixeira e Natália Tringali**, companheiras fiéis de todas as jornadas.

À **Marilde Aires Costa e Tomé Pimentel** pela amizade e pelo apoio, sempre presentes.

Aos amigos **Waldermaks Leite, Ricardo Marques, Ivan Xavier e Manoel Novais**, pela amizade e auxílio direto em todos os momentos durante a execução dos meus experimentos.

Às amigas da **Molecular Core** pela amizade, pelo companheirismo e incentivo constantes.

À **Magda Bignotto** que sempre esteve disposta a ajudar com as dosagens hormonais.

À **Maria Cristina Jorge** pela paciência que é possível somente para quem vive entre o conhecimento.

Aos servidores técnico-administrativos do Departamento, especialmente **Nereide Garcia, Júlio Nascimento e Valéria Acquilino**.

Ao **Leandro Pimentel e Antonio da Silva Moraes**, que sempre estiveram dispostos a solucionar todos os problemas de informática.

Ao **Nelson da Silva, João Bosco e Sebastião da Silva** que cuidam de nossa entrada e saída do prédio a qualquer hora do dia ou da noite.

Aos **RATOS** que participaram deste estudo, pois sem os quais este trabalho não seria possível.

A **AFIP e FAPESP** pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

“Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Antoine de Saint Exupery

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	xvii
Lista de figuras	xviii
Resumo	xix
Abstract	xx
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Comportamento Sexual	2
1.1.2 Comportamento sexual e regulação hormonal em machos	4
1.2 Influência hormonal no ciclo espermático	6
1.3 Privação de sono	9
1.3.1 Privação de sono paradoxal e comportamento sexual	11
1.3.2 Privação de sono paradoxal e hormônios	14
1.4 Interação da privação de sono paradoxal, comportamento sexual e espermatogênese	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAL E MÉTODO	27
4.1 Animais	28
4.2 Treino de comportamento sexual	28
4.3 Drogas	29
<i>Artigo 1: Influence of progesterone on sexual performance in male rats (Journal of Sexual Medicine 2010;7:2435-2444)</i>	29
4.4 Grupos experimentais	29
4.5 Procedimento experimental	30
4.6 Análise hormonal	31
4.7 Análise estatística	31
<i>Artigo 2: The effect of sleep loss on the reproductive function of male rats (submetido)</i>	32
4.8 Grupos experimentais	32
4.9 Procedimento experimental	32
4.10 Privação de sono paradoxal	33
4.11 Restrição de sono	34

4.12	Avaliação do comportamento sexual	35
4.13	Espermograma	37
4.14	Análise hormonal	39
4.15	Análise estatística	39
5.	RESULTADOS	41
	<i>Artigo 1: Influence of progesterone on sexual performance in male rats (Journal of Sexual Medicine 2010;7:2435-2444)</i>	42
	<i>Artigo 2: The effect of sleep loss on the reproductive function of male rats (submetido)</i>	53
6.	DISCUSSÃO	81
6.1	Artigo 1	82
6.2	Artigo 2	89
7	CONCLUSÕES	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
9	ANEXO	109

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH:	hormônio adrenocorticotrófico
CS:	comportamento sexual
CTRL:	controle
DHT:	dihidrotestosterona
E ₂ :	estradiol
EDTA:	ácido etilenodiamino tetra-acético
FSH:	hormônio folículoestimulante
GH:	do inglês <i>growth hormone</i>
HPA:	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HPG:	eixo hipotálamo-hipófise-gonadal
HPT:	eixo hipotálamo-hipófise-teróide
III:	intervalo inter-intromissão
IIC:	intervalo inter-copulatório
IC:	índice copulatório
LE:	latência de ejaculação
LH:	hormônio luteinizante
LI:	latência de intromissão
LM:	latência de monta
NI:	número de intromissão
NM:	número de monta
NREM:	do inglês <i>non rapid eye movement</i>
NTE:	número total de ejaculações
NTI:	número total de intromissões
NTM:	número total de montas
PSP:	privação de sono paradoxal
REM:	do inglês <i>rapid eye movement</i>
RS:	restrição de sono
SP:	sono paradoxal
TSH:	hormônio tireoestimulante

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação dos padrões de comportamento sexual	3
Figura 2.	Processo de espermatogênese	7
Figura 3.	Mecanismos de controle hormonal do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal .	9
Figura 4.	Perfil hormonal do hormônio de crescimento, cortisol, hormônio tireoestimulante e prolactina	15
Figura 5.	Avaliação das concentrações de testosterona (A) e progesterona (B) . . .	16
Figura 6.	Avaliação das concentrações de corticosterona (A) e adrenocorticotrópico (ACTH) (B)	20
Figura 7.	Esquema da espermatogênese indicando sequências de eventos e hormônios	22
Figura 8.	Esquema de treino para adquirir experiência sexual em ratos	29
Figura 9.	Protocolo experimental realizado no Artigo 1	30
Figura 10.	Protocolo experimental realizado no Artigo 2	33
Figura 11.	Ratos privados de sono paradoxal pelo método da plataforma múltipla modificada	34
Figura 12.	Representação do protocolo de restrição de sono	35
Figura 13.	Ilustração de comportamento sexual emitido pelo rato	37
Figura 14.	Parâmetros microscópicos analisados no teste de espermograma	38

RESUMO

Tem sido documentado que a experiência copulatória pode alterar o desempenho sexual em ratos machos. No entanto, as bases hormonais e o número de cópulas necessárias para o rato adquirir experiência sexual ainda não estão claramente estabelecidos. Por outro lado, as alterações hormonais podem ser resultantes de diversos fatores, em especial a falta de sono. A diminuição do tempo de sono presente na sociedade atual quer seja pelo excesso de trabalho ou até mesmo a troca do tempo de sono por momentos de lazer, pode levar ao comprometimento de diversas funções do nosso organismo, em especial o bom funcionamento do sistema endócrino que pode acarretar em prejuízos no comportamento sexual e consequentemente na função reprodutiva. Neste sentido, a presente etapa se divide em 2 estudos: no Artigo 1 determinamos o tempo necessário para o rato adquirir experiência sexual bem como o perfil hormonal de ratos sexualmente ativos e inexperientes. No Artigo 2 avaliamos a influência da falta de sono no comportamento sexual (CS), perfil hormonal e parâmetros espermáticos em ratos sexualmente experientes. Para a realização do Artigo 1, ratos machos foram submetidos ao treino de CS na presença de fêmeas receptivas durante 9 dias intercalados. Os resultados indicaram que durante esse período, 42,5% dos animais apresentaram excelente desempenho sexual, 17,5% mostraram um desempenho adequado, 7,5% tiveram baixa atividade e inesperadamente 32,5% dos animais não apresentaram nenhuma resposta sexual. Em relação aos resultados hormonais, os ratos com baixo/nenhum desempenho apresentaram menores concentrações de progesterona comparadas aos animais de excelente/adequado desempenho. A testosterona, por sua vez, foi significativamente reduzida nos animais de baixa/nenhuma atividade comparados com os animais de excelente/adequado desempenho. No Artigo 2, os ratos sexualmente ativos foram submetidos à privação de sono paradoxal durante 96 horas (PSP96h) ou a restrição de sono por 21 dias consecutivos (RS21d) que consiste em expor os animais a PSP por 18 horas e as 6 horas restantes deixá-los na gaiola moradia. Os grupos controles (CTRL) foram mantidos em gaiola de moradia durante todo o experimento. Em seguida foram avaliados o CS, o perfil hormonal e também o espermograma desses animais. Verificou-se que a PSP 96h foi capaz de diminuir o desempenho sexual. Entretanto, a RS21d não alterou o CS dos ratos em relação ao grupo CTRL. Quanto às alterações hormonais, os ratos submetidos à PSP 96h tiveram uma diminuição das concentrações de testosterona. A progesterona, LH e FSH não apresentaram nenhuma alteração significativa após os protocolos de falta de sono. Em relação à análise do sêmen, tanto o grupo PSP 96h como o grupo RS21d apresentaram uma menor viabilidade espermática em relação ao grupo CTRL. No entanto, a diminuição dos espermatozoides vivos foi mais acentuada no grupo PSP 96h do que no grupo RS21d. Tomados em conjunto, os achados do presente estudo indicam que além da testosterona, a progesterona também é um fator limitante para o bom desempenho dos ratos machos. Além disso, os animais com excelente atividade sexual, quando submetidos à PSP, apresentaram uma diminuição do desempenho sexual, da viabilidade espermática e ainda das concentrações de testosterona. Similarmente, os animais que foram restritos de sono, também tiveram comprometimento na porcentagem de espermatozoides vivos. Assim, nossos resultados sugerem que para manter uma resposta sexual adequada é necessária concentrações ideais não só de testosterona, mas também do hormônio tipicamente feminino, a progesterona. Ainda, independente das concentrações hormonais envolvidas na cascata de formação dos espermatozoides, a falta de sono prejudica a função reprodutiva de ratos machos.

ABSTRACT

It has been reported that copulatory experience may actually alter sexual performance in male rats. But indicating experience is a risky proposition since the statement is made in the absence of an established hormonal basis and number of copulations that define sexual experience condition. And also, the associated hormonal alterations observed in sexually high performing rats could have been caused by factors other than experience, such as sleep deprivation (SD). Whether it is trading sleep time for leisure time or for work, the shortage of sleep in present day society may lead to adverse alterations in body functions, even in the endocrine system, prompting changes sexual behavior and therefore, in reproductive function. In light of such considerations the current stage of the overall investigation forks into 2 studies: Study 1 seeks to determine the required time for the rat to acquire sexual experience as well as the hormonal profile of sexually active and sexually naïve rats. Study 2 examines the influence of sleep shortage upon sexual behavior (SB), hormonal profile, and spermatic parameters in sexually experienced rats. In Study 1 male rats underwent SB training in the presence of receptive females every other day over a nine-day period. Results show that throughout this period 42.5% of the subjects displayed excellent sexual performance, 17.5% had adequate performance, 7.5% had low sexual activity and an unexpected 32.5% showed no sexual response at all. The hormonal analysis that followed showed that, when compared to subjects with adequate/excellent performance, the progesterone concentrations in the rats whose sexual performance was low or nil were decreased, as were those of testosterone. In Study 2 sexually experienced subjects underwent to a PSD protocol for 96h (PSD96h) and a sleep restriction protocol for 21 consecutive days (SR21d). In the latter, subjects experienced 18h of sleep deprivation followed by 6h in their home cages. Control groups (CTRL) remained in their home cages throughout the entire protocol. SB, hormonal profile and sperm analysis were assessed and it was found that PSD96h reduced sexual performance but SR21d did not alter SB in the rat subjects when compared to CTRL. As for hormonal alterations, the subjects submitted to PSD96h experienced a reduction in their levels of testosterone but no alterations occurred in the concentrations of progesterone, LH, and FSH. As for the semen analysis, both groups (PSD96h and SR21d), presented lower spermatic viability in relation to the CTRL. However, the loss of live spermatozooids was more pronounced in the PSD96h group than in the SR21d group. Taken together, the findings herein indicate that in addition to testosterone, progesterone is also a limiting factor in the sexual performance of male rats. And furthermore, that when submitted to PSD96h, rat subjects with excellent sexual activity loose sexual performance and also, they experience loss of spermatic viability as well as suffer decreases in testosterone concentrations. Likewise, there were also detrimental effects in the percentage of live spermatozooids in the SR21d subjects. The current study thus indicates that in order to maintain adequate sexual response an ideal concentration of not only testosterone but of the typically female hormone progesterone is also required. And also, regardless of the concentrations of one or another hormone involved in the cascade of events leading to spermatozoid formation, lack of sleep can be singled out as a detrimental factor in the reproductive function of male rats.

1 Introdução

1.1 Comportamento Sexual

O uso de modelos animais é de grande importância para elucidar os possíveis mecanismos que estão envolvidos no comportamento sexual (CS). Em especial, o rato de laboratório é o modelo animal mais utilizado para avaliar a interação das bases neuroendócrinas do CS, não somente pela facilidade de manipulação, mas também pela identificação bem estabelecida do seu padrão sexual.

Em ratos, o CS é expressado por montas, sem ou com inserção peniana, culminando com a ejaculação. A fêmea receptiva responde a cada movimento do macho com uma lordose, caracterizada pela dorso flexão, elevação da região pélvica e deflexão lateral da cauda para melhor acesso do macho à vagina. A *monta* é caracterizada pela presença de movimentos pélvicos do macho, porém sem inserção do pênis na vagina da fêmea (Figura 1A). Por sua vez, a *intromissão* (montas com inserção peniana) se diferencia da monta por apresentar movimentos pélvicos profundos, seguidos de uma desmonta mais abrupta. Geralmente, o macho consegue fazer a penetração vaginal em 50 a 80% das montas (Figura 1B). Finalmente, a *ejaculação*, caracteriza-se por inserção pélvica profunda (com emissão do líquido seminal dentro da vagina), seguida de movimento lateral da pata anterior e uma desmonta lenta. Ocorre depois de 6 a 12 intromissões, seguida de um período refratário de 4 a 8 minutos (no qual o macho não apresenta nenhuma atividade copulatória independente da presença da mesma fêmea) (Figura 1C).

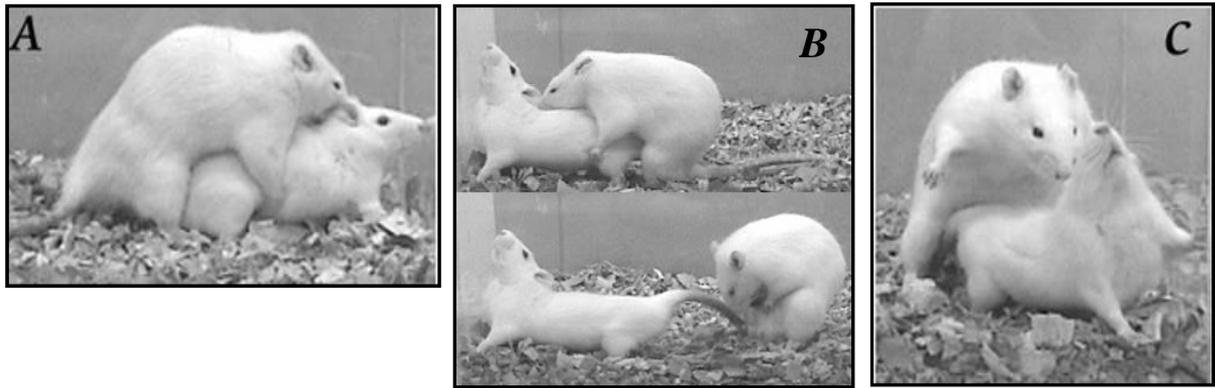


Figura 1. Representação dos padrões de comportamento sexual em ratos machos. (A) Monta; (B) Intromissão; (C) Ejaculação. Fonte: Manzo et al., (2002).

A atividade copulatória do macho também envolve a interação de 3 outros fatores: o componente motor que define a coordenação dos músculos que participam durante a monta e a execução de movimentos pélvicos rítmicos e alternados; um componente genital externo que inclui respostas vasculares e musculares que determinam a ereção e a inserção peniana intravaginal; e o genital interno que envolve a atividade secretora e contrátil dos diversos órgãos que participam na emissão do líquido seminal (Larsson, 1956).

Ainda, a experiência sexual em ratos pode produzir uma série de alterações hormonais que podem favorecer a resposta do CS de forma mais acentuada. No entanto, não há um consenso na literatura a respeito desse tema. A experiência sexual apesar de ser um fator importante na determinação do bom desempenho sexual, uma vez que alguns ratos podem não apresentar nenhum comportamento, ainda é pouco estudada. Tem sido descrito que a experiência copulatória pode alterar o CS de ratos machos (Meisel e Sachs, 1994) e que alguns ratos apresentam atividade sexual reduzida na presença de uma fêmea receptiva (Dahlof e Larsson, 1978; Frankel, 1981; Pfaus e Wilkins, 1995; Bialy et al., 2000; Sura et al., 2001). Por exemplo, Chu e colaboradores (2008) relataram que alguns ratos apresentavam baixo índice de motivação espontânea e comportamento copulatório durante a primeira exposição à fêmea. Neste sentido, seria tendencioso

comparar um rato sexualmente inexperiente (*naïve*) que normalmente apresenta baixa atividade sexual durante a sessão de treino com um rato sexualmente experiente com bom desempenho sexual. Além disso, sabe-se que experiência sexual não resulta somente em alterações comportamentais, mas também alterações hormonais, repetida exposição a cópula, intensidade do treino para adquirir experiência sexual no qual o animal foi submetido, ou até mesmo a linhagem do animal de escolha.

1.1.2 Comportamento sexual e regulação hormonal em machos

Existem inúmeros estudos que demonstram a influência dos fatores hormonais como determinantes da expressão global da atividade copulatória. A expressão do CS em mamíferos é modulada por ação de andrógenos, que modulam o desenvolvimento e manutenção das características masculinas, incluindo a atividade e desenvolvimento dos órgãos sexuais. Deste modo, as alterações nas concentrações desses hormônios circulantes podem acarretar mudanças neste comportamento.

A testosterona é um dos principais hormônios no CS masculino. É secretada pelas células de Leydig nos testículos e metabolizada em estradiol (E₂) por meio da enzima aromatase, ou em dihidrotestosterona (DHT) com o auxílio da enzima 5 α -redutase. A testosterona plasmática é indetectável após 24 horas de castração (Krey e McGinnis, 1990), enquanto a atividade copulatória diminui gradualmente durante dias ou semanas subsequentes (Cross e Roseli, 1999). Ratos machos adultos submetidos a estresse durante a fase pré-natal apresentam diminuição de testosterona e conseqüentemente, redução da atividade copulatória (Gerardin et al., 2005). Mais recentemente, Pereira e colaboradores (2006) demonstraram que a administração neonatal de testosterona em filhotes de mães estressadas durante a gestação foi capaz de inibir os prejuízos no CS na fase

adulta. Além disso, a intensidade e a experiência sexual podem alterar os níveis de testosterona. Diversos estudos mostram que ratos sexualmente experientes apresentam um aumento da concentração de testosterona plasmática (Manzo et al., 2002; Wu e Gore, 2009), e hipocampal (Edinger e Frye, 2007). Ainda, essa alteração da concentração de testosterona pode ser decorrente da atividade da aromatase, uma vez que a testosterona também é metabolizada no cérebro através da aromatização em estradiol. Assim, a conversão da testosterona em estradiol poderia apresentar um papel importante na indução do comportamento de lordose em ratos machos (Beyer et al., 1976). Portillo e colaboradores (2006) confirmaram a hipótese de que a concentração da atividade da aromatase no cérebro é menor em ratos que não apresentam nenhum CS. Neste sentido, pode-se afirmar que o estradiol também está envolvido no repertório do CS.

Além desses estudos, algumas evidências mais recentes têm voltado à atenção para outro hormônio, tipicamente relacionado com o comportamento feminino, a progesterona. Nosso grupo publicou uma série de artigos documentando a relação da progesterona com o aumento de reflexos genitais, um dos componentes do CS em ratos machos (para revisão ver Andersen e Tufik, 2006). Mais especificamente, o aumento de progesterona foi associado com a ocorrência de ereções e ejaculações em ratos submetidos à privação de sono paradoxal (PSP) (Andersen et al., 2002, 2003, 2004a, 2005, 2006a, 2007). Assim, além da testosterona, há evidências que indicam uma possível influência do estradiol e também da progesterona na função sexual do macho.

1.2 Influência hormonal no ciclo espermático

A espermiogênese é um processo de metamorfose que envolve a maturação e diferenciação precoce dos gametas haplóides do sexo masculino para um espermatozoide maduro. Durante a espermiogênese, as alterações nos gametas masculinos ocorrem nas proteínas nucleares, diferenciando o tamanho e forma

celular, tamanho dos grânulos de posição pro-acrossomal e a localização dos centríolos. A diferenciação que converte gametas haplóides imóveis a uma célula alongada com potencial para movimentar-se é regulado por mecanismos complexos, sendo os hormônios um dos fatores importantes envolvidos na formação do espermatozóide. Esse processo ocorre no interior dos túbulos seminíferos presentes nos testículos.

O processo de espermatogênese se inicia durante a vida embrionária, com a formação das células germinativas, que permanecem em estado latente até a puberdade. Com a liberação das gonadotropinas hipofisárias, se inicia o processo de amadurecimento das células germinativas, e conseqüentemente formação dos espermatozóides (Herms e Clermont, 1995), como demonstrado na Figura 2.

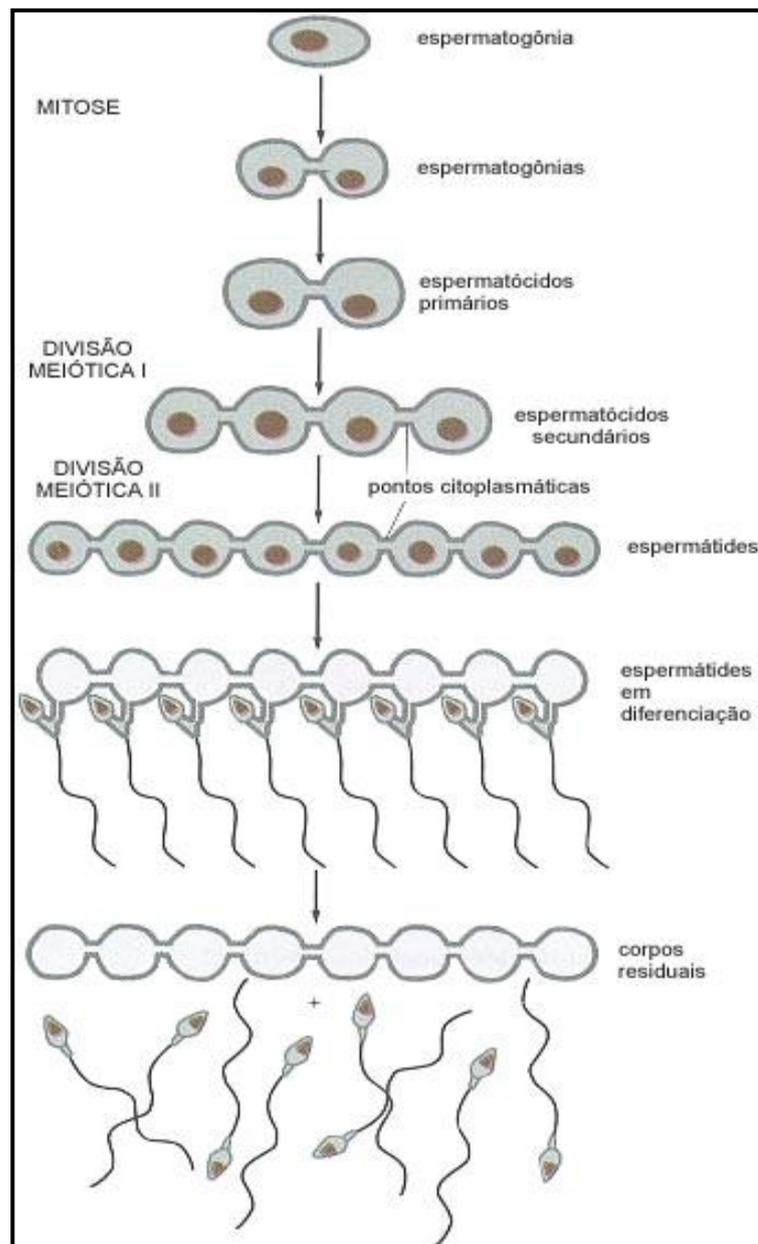


Figura 2. Processo de espermatogênes. Fonte: (<http://www.sabedoria.ebrasil.net>)

Hormônios gonadotróficos como o folículoestimulante (FSH), luteinizante (LH) e testosterona são essenciais para a formação de espermatozoides (para revisão Sofikitis et al., 2008; Walker, 2009; Ruwanpura et al., 2010). Estes hormônios estão envolvidos principalmente com o processo de divisão celular da espermatogênese que consiste na produção dos espermatozoides (Lo et al., 2004). No entanto, há controvérsias na literatura a respeito da participação do FSH neste processo. Alguns estudos mencionam que o FSH estaria envolvido no início do

processo da espermatogênese, agindo principalmente na proliferação das espermatogônias ou no processo de meiose. Considerando que a testosterona potencializa a ação do FSH há a possibilidade da testosterona também estar envolvida na estimulação do processo de diferenciação das espermatídes. Além disso, a testosterona tem sido considerada como um suporte para a diferenciação completa das espermatídes (Mclachlan et al., 1995; Singh e Handelsman, 1996; Sousa et al., 2002). A secreção de LH é regulada pelo mecanismo de *feedback* em função da concentração plasmática de testosterona circulante, que controla a secreção endócrina da hipófise e do hipotálamo (Hermo e Clermont, 1995). A secreção de FSH é regulada pela testosterona plasmática e também pela inibina, um hormônio peptídico produzido pelas células de Sertoli. Na Figura 3, pode-se observar o mecanismo de controle hormonal através do eixo hipotálamo-hipofise-gonadal.

Outros hormônios, como a progesterona, também vem sendo relacionados com o processo de diferenciação celular da espermatogênese. Recentemente foi demonstrado em homens que a progesterona exerce uma influência na espermiogênese, em relação a capacitação espermática reação/acrossoma e principalmente a biossíntese de testosterona nas células de Leydig (Oettel e Mukhopadhyay, 2004).

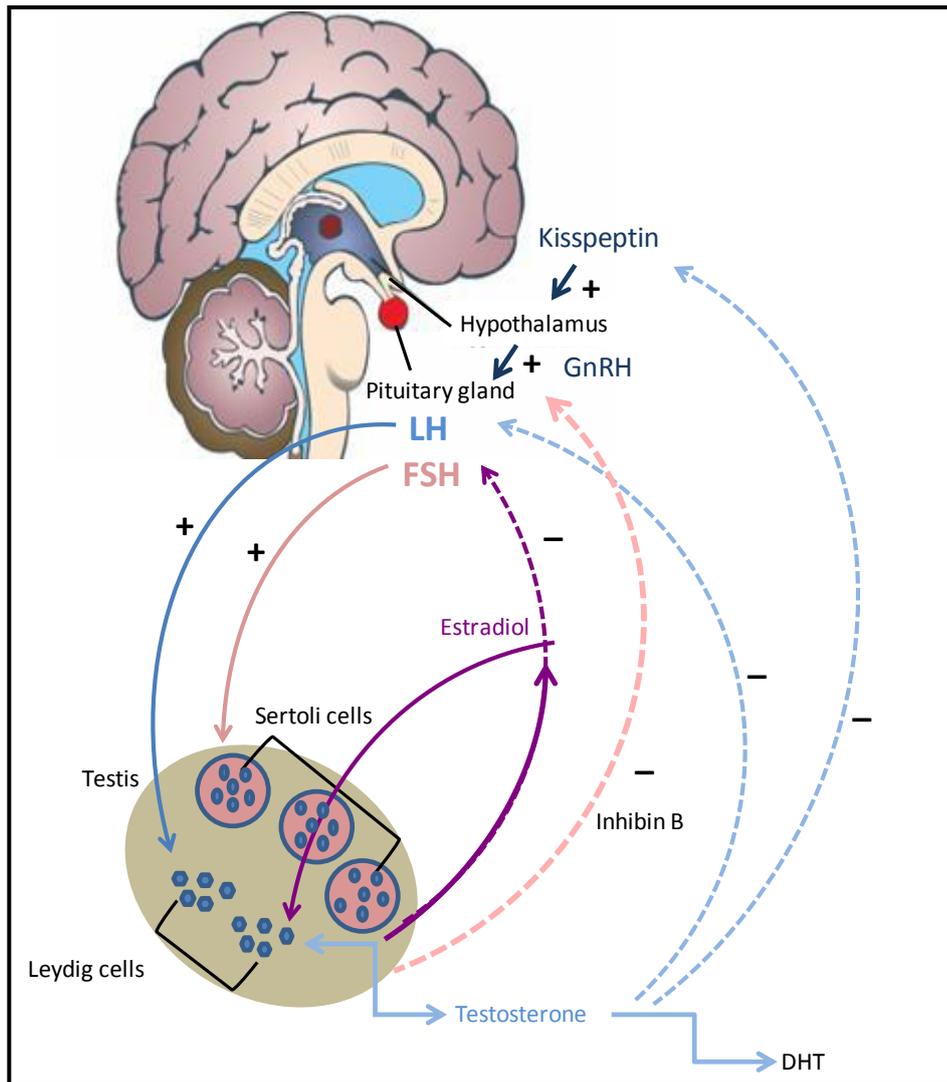


Figura 3. Mecanismo de controle hormonal do eixo hipotálamo-hipofise-gonadal. Fonte: Andersen et al.(submetido).

1.3 Privação de sono

Por conta de avanços tecnológicos, aumento do padrão de vida e acesso a serviços médicos, a expectativa de vida tem aumentado globalmente. É fato que nos últimos 50 anos tem havido um aumento substancial da expectativa de vida na maioria das populações. Porém, é este estilo de vida moderno que tem levado pessoas de várias faixas etárias e de culturas diferentes dentro de uma

mesma população a dormir menos. Fatores como vida social intensa, luz artificial, trabalho de turno e aumento da prevalência de distúrbios de sono, levam ao encurtamento do tempo de sono bem como à deterioração da qualidade do sono, e isto tem se tornado um problema de saúde pública crescente.

A restrição crônica de sono, motivo pelo qual se cria este débito, é frequentemente relacionada a imposições da vida moderna, como, por exemplo, demandas profissionais, responsabilidades sociais e domésticas e estilo de vida, além de privação voluntária de sono. Recentemente, Van Cauter e colaboradores (2008) ressaltam a diminuição de até 2 horas de sono por noite em adultos e adolescentes nas últimas 5 décadas.

Uma vez que cada sistema orgânico possui um papel distinto e crítico na adaptação de mudanças ambientais contínuas e desafiadoras, torna-se fundamental a condução de estudos visando investigar a maneira pela qual diferentes sistemas são afetados pela perda do sono.

Diferentes metodologias vem sendo utilizadas para tentar esclarecer a importância das fases do sono como um todo. Entre elas, a privação total de sono, a restrição de sono (RS) ou a privação seletiva de uma fase do sono, como por exemplo, a PSP. De fato, a privação de sono em homens e animais provoca diversas alterações, como, por exemplo, aspectos negativo sobre o desempenho psicomotor e cognitivo, variações de humor, disfunções metabólicas, parâmetros comportamentais, entre outros (Tufik et al., 1978, 2009; Frussa-Filho et al., 2004; Antunes et al., 2006; Allard et al., 2007; Fukushiro et al., 2007; Perry et al., 2008, 2011; Beneditte et al., 2008; Tasali et al., 2008; Alvarenga et al., 2008, 2009; Martins et al., 2010) ou aspectos positivos como o efeito antidepressivo (Giedke e Schwärzler 2002; Benedetti et al., 2007; Howland, 2011) e facilitatório dos reflexos genitais (Andersen et al., 2005, 2006a, 2007).

No modo de vida atual, a maior parte da privação do sono ocorre na fase de sono paradoxal (SP)/sono REM*, ou seja, na segunda metade da noite. Assim, muitos investigadores desenvolveram e empregam diferentes metodologias na redução ou abolição do SP. Ainda, mais recentemente foi estabelecido o método de RS, que visa mimetizar a situação de débito de sono crônico encontrado na sociedade atual. No entanto, como é uma metodologia nova, existem poucos estudos abordando esse tema, principalmente na questão hormonal e no CS.

1.3.1 Privação de sono paradoxal e comportamento sexual

O comprometimento da função reprodutiva de seres humanos e de espécies animais tem sido motivo de especial preocupação nos últimos anos. Muitos fatores podem interferir com os componentes e com a função reprodutiva e ocasionar infertilidade e outras alterações funcionais e estruturais. Doenças, fatores psicológicos, estresse e variações hormonais, são alguns dos fatores que contribuem para o surgimento de distúrbios no sistema reprodutivo masculino (Neubert e Chahoud, 1995). Um levantamento feito em 2010 mostrou uma alta prevalência de disfunção erétil em homens entre 18 e 40. Esses achados ainda foram relacionados com problemas psicossociais e não com problemas orgânicos (Martins e Abdo, 2010). Atualmente, o estresse combinado com as pressões socioeconômicas da sociedade culmina com o aumento da jornada de trabalho e conseqüentemente, diminuição do tempo total de sono dos indivíduos. De fato, a restrição crônica de sono tornou-se um problema comum, principalmente nas sociedades industrializadas, afetando cerca de 45% dos adultos (Bonnet e Arand, 1995). Estudos epidemiológicos indicam que o tempo total de sono de um adulto no ano de 1960 era de 8,0 a 8,9 horas por noite (Kripke, 1979), enquanto que em 2000

* Adotamos a denominação de sono de ondas lentas (SOL) e sono paradoxal (SP) para referir aos estágios de sono em ratos, e sono NREM e REM como referências em seres humanos.

esse período foi progressivamente reduzido para 6,9 a 7,0 horas (National Sleep Foundation, 2002). Nos anos 60, Dement (1960) relatou o efeito da privação de sono sobre o CS em animais. Primeiramente, ele estudou 12 gatos machos privados de sono por 30 dias. Os resultados mostraram que em 6 deles houve aumento marcante no CS, enquanto que no grupo controle não houve nenhuma alteração. Semelhantemente, em outro estudo verificou-se igualmente que após PSP por mais de 8 dias ocorria hipersexualidade em gatos (Vimont-Vicary et al., 1966). Anos mais tarde, Ferguson e Dement (1969) mostraram que ratos machos expostos a PSP e após a administração de anfetamina, apresentavam o comportamento de monta, mas sem orientação espacial.

A PSP por 96 horas apresenta também aspectos positivos, especificamente na motivação sexual, como aumento da frequência de ereções e ejaculações espontânea em ratos (Andersen e Tufik, 2002). Por outro lado, a fragmentação crônica de sono, como por exemplo, a que ocorre na apnéia do sono pode levar à disfunção erétil (Soukhova-O'Hare et al., 2007; Andersen et al., 2010). Assim, há indícios de que a duração da perda de sono pode ser um importante fator na resposta sexual. No entanto, poucos estudos até este momento associaram a qualidade de sono com a função sexual masculina.

Nos últimos anos, nosso grupo tem investigado os efeitos da falta de sono na função erétil. De fato, a PSP apresenta um efeito facilitatório sobre os reflexos genitais (ereções e ejaculações), uma vez que 50% dos animais apresentam espontaneamente ereção e 20% ejaculam após serem privados seletivamente de sono paradoxal (Andersen e Tufik, 2002). Esses efeitos foram observados tanto em ratos jovens (Andersen et al., 2003), adultos (Andersen et al., 2005, 2006a, 2007; Andersen e Tufik, 2006; Alvarenga et al., 2006) como idosos (Andersen et al., 2002, 2004a).

A ereção e ejaculação representam 2 comportamentos fundamentais para a resposta motivacional do CS. Porém, a avaliação do repertório completo do CS envolve tanto comportamentos motivacionais quanto respostas do desempenho, representada pelos comportamentos de montas, intromissões e ejaculações. Nesse sentido, recentemente demonstramos que na presença de fêmeas receptivas, há uma redução no desempenho sexual de ratos expostos a PSP por 96h quando comparados a ratos com padrão de sono normal (Alvarenga et al., 2009). Essa diminuição do desempenho foi representada pelo aumento da latência para iniciar o comportamento de monta e intromissão, e diminuição do número de intromissões quando comparados ao grupo controle. Assim, esses dados indicam que a PSP interfere com os mecanismos que regulam o CS masculino. De acordo com Verma e colaboradores (1991) a PSP por 3 dias resultou em aumento do CS em ratos, uma vez que houve elevação da frequência de intromissões e redução da latência para ejaculação. Por outro lado, outro estudo demonstrou que ratos PSP não apresentaram alterações significativas em seu desempenho sexual (Hicks et al., 1991). Por sua vez, a diminuição do tempo de sono prolongado durante 20 dias resultou numa porcentagem diminuída de ratos que apresentaram monta, intromissões e ejaculações quando comparados aos controles (Velazquez-Moctezuma et al., 1996).

Interesse sexual elevado foi também demonstrado em indivíduos do sexo masculino privados de sono REM por 2 noites por meio de estímulos aplicados imediatamente antes do início dos episódios de sono REM (Zarcone et al., 1974). O interesse sexual foi definido pelo número de fotografias com figuras femininas nas quais os indivíduos escolheram. Além disso, os pacientes com impotência psicogênica demonstraram aumento do intumescimento peniano e rigidez após 24 horas de privação de sono sob estimulação audiovisual experimental (Ferini-Strampi et al., 1996). Assim, esses dados indicam que a diminuição do tempo de sono interfere com os mecanismos que regulam o CS, mas a duração e a extensão da

participação das condições de estresse deveria ser considerada como um fator relevante envolvido nesse efeito.

De fato a resposta do CS pode variar de acordo com modalidade e intensidade do estresse (Retana-Márquez et al., 2003). Dependendo do gênero e da idade em que os ratos forem submetidos ao estresse, por exemplo manipulação neonatal ou estresse pré-natal, também pode promover alterações hormonais durante a idade adulta, em especial alterações no CS (Gerardin et al., 2005; Gomes et al., 2006; Pereira et al., 2006). No entanto, a PSP tem um componente inerente de estresse muito difícil de dissociar das consequências produzidas pela falta de sono. Contudo, em relação ao CS e sono, até o momento, o quadro permanece obscuro e é nesse cenário que este estudo se insere.

1.3.2 Privação de sono paradoxal e hormônios

As vias subjacentes da interação da privação de sono e as alterações comportamentais envolvem múltiplos sistemas fisiológicos, entre eles o endócrino. Estudos relacionando modelos animais de PSP e hormônios foram iniciados na década de 1980 pelo grupo mexicano liderado por Javier Velázquez-Moctezuma enfocando principalmente os hormônios gonadais. Para isso, ratos machos gonadectomizados foram submetidos à PSP durante 120 horas e sua resposta sexual hetero e homotípica ao benzoato de estradiol foi testada, haja vista que a PSP facilita a indução do comportamento de lordose em fêmeas tratadas com esse hormônio (Velazquez-Moctezuma et al., 1984). Os resultados demonstraram que a PSP por si só não produziu a resposta de lordose. Contudo, um efeito marcadamente positivo foi observado após o tratamento com estrógeno sobre o CS feminino comparado com grupos não privados de sono (Canchola et al., 1986).

Em humanos, além dos hormônios gonadais, outros hormônios também sofrem alterações decorrente da PSP em voluntários saudáveis. Van Cauter e colaboradores (1991) demonstraram que adultos jovens privados de sono das 23 às 7 horas (8 horas de sono total neste caso) apresentam alterações nos hormônios tireoestimulante (TSH), prolactina e cortisol. Ainda, esses hormônios não voltaram aos valores normais após o sono normal da noite subsequente a privação de sono (Figura 4).

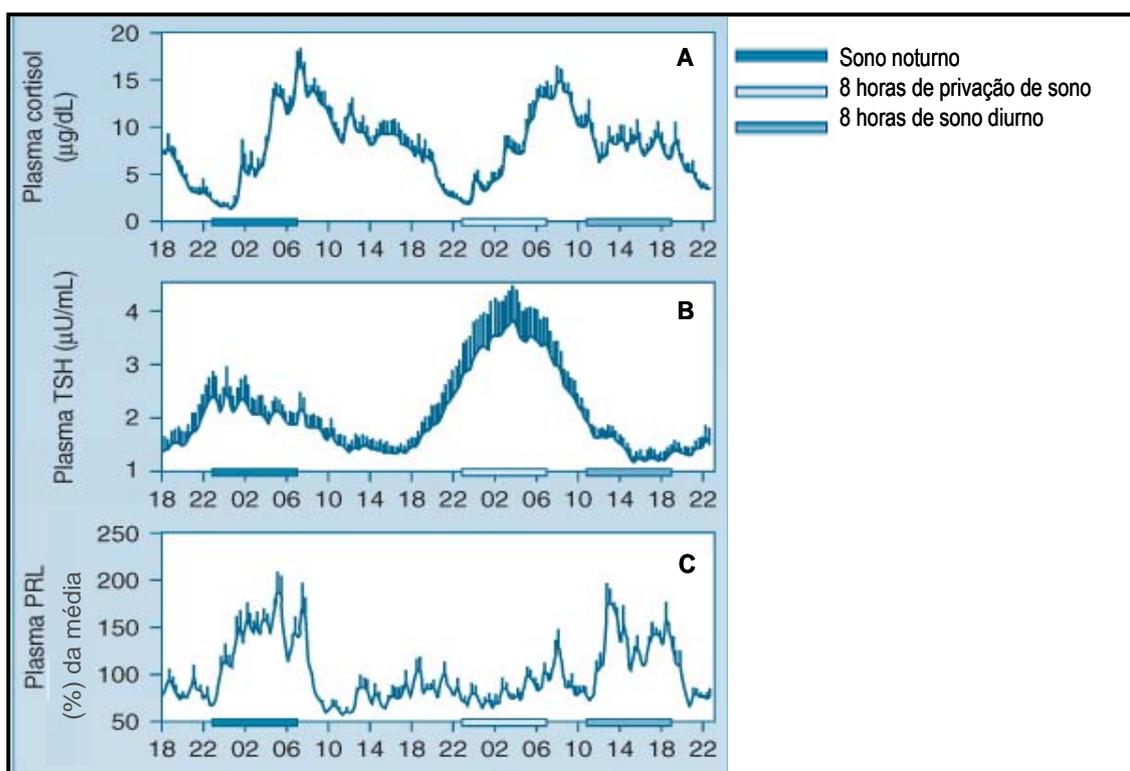


Figura 4. Perfil hormonal de cortisol (A), hormônio tireoestimulante (TSH) (B) e prolactina (PRL) (C) de 8 homens adultos jovens durante o sono noturno, 8 horas de privação de sono e 8 horas de sono diurno. Os dados são representados em média e erro-padrão. Fonte: modificado de Van Cauter et al. (1991) e Van Cauter e Spiegel (1999).

Em animais também foram observadas algumas alterações no sistema endócrino decorrentes da PSP. Embora a testosterona seja conhecida por exercer os efeitos motivacionais necessários para a demonstração do CS masculino (Roselli e Chambers, 1999), demonstramos que as concentrações desse hormônio estavam significativamente reduzidas após 96 horas de PSP (Figura 5A), em oposição ao aumento expressivo dos reflexos genitais evidenciados nos ratos privados de sono. A progesterona, por sua vez, estava significativamente aumentada nos ratos PSP em relação ao grupo controle (Figura 5B).

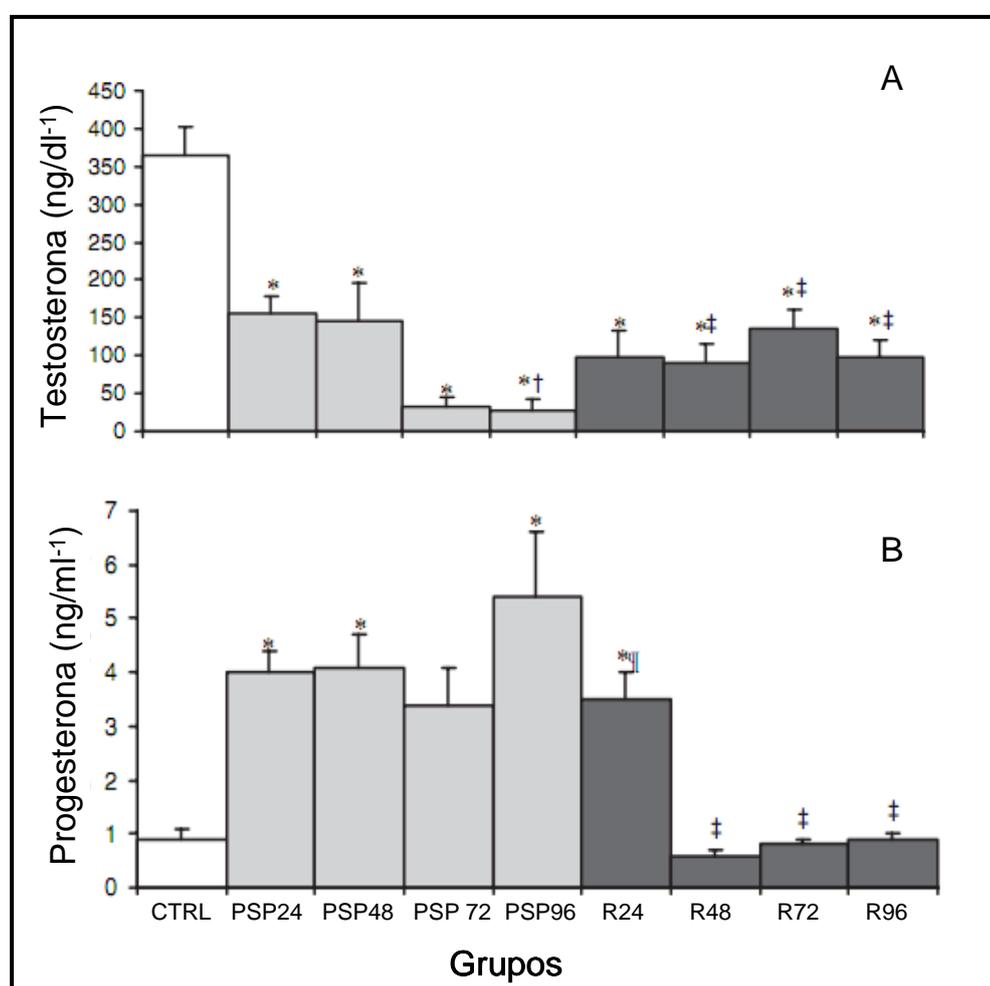


Figura 5. Avaliação das concentrações de testosterona (A) e progesterona (B) após 24, 48, 72 e 96 horas de privação de sono paradoxal (PSP) e após 24, 48, 72 e 96 horas de rebote de sono (R), *difere do grupo controle (CTRL); †difere do grupo PSP 24h; ‡difere do grupo PSP 96h; ‡difere do grupo R24. Fonte: modificado de Andersen et al. (2005).

Evidências recentes indicam que os distúrbios de sono interferem com o sistema endócrino (Boethel, 2002). Embora o CS esteja sob o controle hormonal, a interação entre esses 2 fatores sob o paradigma da PSP permanece como uma área bem pouco investigada. Os efeitos da privação de sono no CS masculino podem ocorrer pela interação direta com componentes do sistema reprodutivo ou indiretamente pela interferência na regulação endócrina, haja vista que o desenvolvimento e a manutenção do sistema reprodutivo é particularmente dependente de uma série de interações hormonais (Whitley et al., 1994; Neubert e Chahoud, 1995). Contudo, pouca atenção tem sido direcionada para o papel da progesterona no CS masculino. Uma possível explicação para o número limitado de estudos a respeito deste tema reside no fato de a progesterona ter uma participação central na reprodução feminina. Além disso, a progesterona, tradicionalmente, é tida por apresentar uma função limitada ou mesmo inexistente no controle do CS masculino (Phelps et al., 1998).

Dando seguimento à investigação das variáveis envolvidas nessas alterações hormonais, nossos estudos demonstraram que esse aumento na concentração de progesterona após a PSP ocorre em diferentes linhagens de rato (ex. Long-Evans), além da Wistar (Andersen et al., 2006a), há um efeito inibitório do antagonista de receptor de progesterona nos eventos eréteis desses animais (Andersen e Tufik, 2005), e a administração de progesterona por 4 dias restabelece a ocorrência de ereções em ratos castrados e privados de sono (Andersen et al., 2004a). Corroborando com nossos dados, há relatos de que a suplementação de progesterona em ratos machos castrados foi capaz de induzir reflexos genitais, mesmo na ausência de outros esteróides gonadais (Witt et al., 1994, 1995). Esses autores relataram que a testosterona isoladamente não restaurava as respostas sexuais típicas nos machos, a menos que as concentrações de progesterona estivessem elevadas. Com o aumento da concentração da progesterona encontrada nos estudos anteriores e sua participação na indução de ereção em ratos castrados,

a progesterona parece ser um fator hormonal de suma importância na resposta motivacional do CS masculino (Andersen e Tufik, 2006).

A progesterona está presente em um amplo espectro de atividade biológica dentro de uma variedade de tecidos. Este hormônio pode influenciar diversos comportamentos, como por exemplo, reprodução, humor, apetite, aprendizagem, memória, atividade sexual e ainda, a qualidade do sono e a respiração. A progesterona produz um efeito hipnótico/indutor de sono e é um potente estimulante para atividade respiratória em homens. Por esse motivo, tem sido associada a uma diminuição do número de episódios de apnéias centrais e obstrutivas do sono (para revisão ver Andersen et al., 2006b).

Considerando que a ereção é um fenômeno característico do sono paradoxal, a modulação exercida pela progesterona nos reflexos genitais poderia ser atribuída aos seus efeitos sobre o sono paradoxal. Nossos dados mostram que a mifepristona, antagonista de receptor de progesterona, diminuiu a duração dos episódios de sono paradoxal, além de diminuir reflexos genitais (Andersen et al., 2005). Assim, esse achado sugere que a progesterona deva estar envolvida na regulação do sono paradoxal e parece exercer um papel funcional na regulação do CS masculino.

Tomados em conjunto, esses estudos contribuem com os dados da literatura sobre a influência da progesterona na função sexual masculino. Embora o papel da testosterona no CS do macho não possa nem deva ser excluído, há necessidade de estudos adicionais para esclarecer a interação entre esses hormônios nos mecanismos sexuais, especialmente o da progesterona, que, por um longo tempo, foi conhecida somente como um hormônio estritamente feminino.

O cenário que se tem até este momento é que a PSP altera os hormônios sexuais de forma a reduzir a testosterona e a aumentar a progesterona. No entanto, como os efeitos do sono paradoxal também são resultantes do estresse

associado à perda de sono, conduzimos um estudo com o propósito de examinar a influência da PSP, bem como a de outros agentes estressantes nos hormônios esteróides em ratos machos (Andersen et al., 2004b). Os resultados indicaram que os níveis de progesterona estavam elevados nos grupos que receberam choque nas patas e expostos a PSP em relação aos grupos controles, natação, frio e imobilização. Embora essas 2 modalidades tenham sido as únicas capazes de induzir alguma resposta genital (10% dos animais que receberam choque nas patas apresentaram ereção, Andersen et al., 2000), há uma grande diferença entre esses grupos, sugerindo que a alteração hormonal não seja o único fator responsável por esses comportamentos. De fato, um estudo conduzido com estresse de contenção em machos e fêmeas, relacionou a progesterona como um marcador de estresse melhor que a liberação de corticosterona (Kalil, 2010).

O hormônio de resposta ao estresse também se encontra alterado após um período de privação de sono. Quatro dias de PSP são capazes de promover aumento de corticosterona (Figura 6A) e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Figura 6B). No entanto, apenas 24 horas de rebote de sono foram necessárias para reverter esse aumento, tanto de corticosterona quanto de ACTH encontrados após um período de 24 a 96 horas de PSP (Suchecki et al., 2002; Andersen et al., 2003, 2004ab, 2005; Zager et al., 2007).

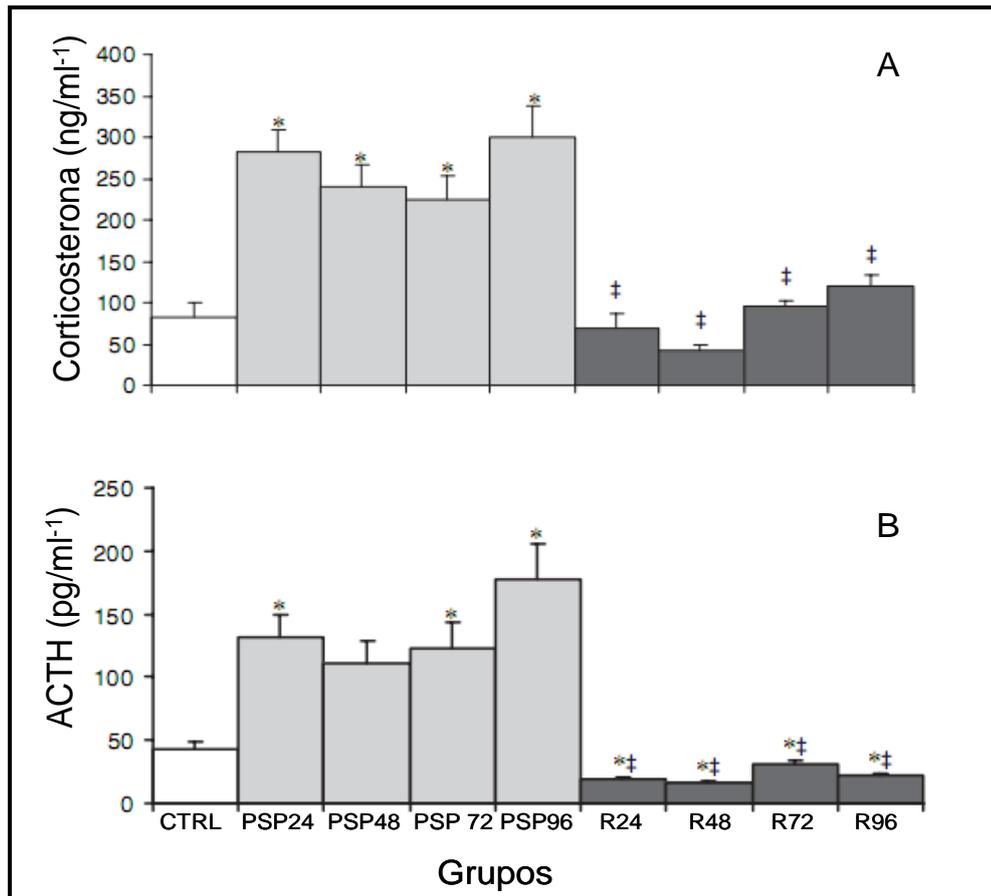


Figura 6. Avaliação das concentrações corticosterona (A) e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (B) após 24, 48, 72 e 96 horas de privação de sono paradoxal (PSP) e após 24, 48, 72 e 96 horas de rebote de sono (R), * difere do grupo controle (CTRL); ‡ difere dos grupos R24-96. Fonte: modificado de Andersen et al. (2005).

Em virtude de pesquisas em Psiconeuroendocrinologia terem sido predominantemente sobre o papel da testosterona no CS, e com base nas muitas evidências que dão suporte a esse fato, há uma resistência natural ao considerar que a progesterona também possa contribuir decisivamente para esse comportamento. Em relação aos nossos achados, acreditamos que eles possam de alguma maneira adicionar mais evidências para a marcante e recente participação da progesterona em eventos essenciais da reprodução, como a ereção. Afortunadamente, pelo menos nos roedores, o envolvimento expressivo da progesterona no CS proporciona novas oportunidades para maior compreensão de seus efeitos hormonais na função reprodutiva.

1.4 Interação da privação de sono paradoxal, comportamento sexual e espermatogênese

O sono é um fenômeno biológico fundamental para a manutenção da saúde e qualidade de vida. Hoje, devido à situação encontrada na sociedade atual, os indivíduos são impostos ou se submetem a longa jornada de trabalho ou até mesmo em busca de uma intensa vida social diminuem seu tempo de sono. A privação ou RS crônica pode prejudicar o bom funcionamento do organismo, em particular, o sistema endócrino. Neste sentido, o impacto do sono na função endócrina tem sido estudado extensivamente, tanto em humanos quanto em roedores. Porém, as alterações relacionadas ao perfil hormonal e a falta de sono nos parâmetros reprodutivos em ratos machos, ainda não estão bem elucidados.

Em relação à função sexual, diversos estudos tem investigado os efeitos da PSP na função erétil. Em particular, a PSP apresenta um efeito facilitatório na ocorrência dos eventos de ereções e ejaculações. Além disso, a PSP diminui as concentrações de um dos principais hormônios masculinos, a testosterona. Por outro lado, promove um aumento de progesterona, hormônio tipicamente feminino. Outros hormônios como FSH, LH, estradiol e corticosterona também se mostram alterados com a falta de sono, no entanto, esses efeitos dependem da intensidade e duração da privação de sono.

Sabe-se que os hormônios esteróides apresentam um importante papel na formação e manutenção da espermatogênese, como representando na Figura 7. Assim, as mudanças no padrão endócrino decorrente da PSP podem alterar o processo reprodutivo.

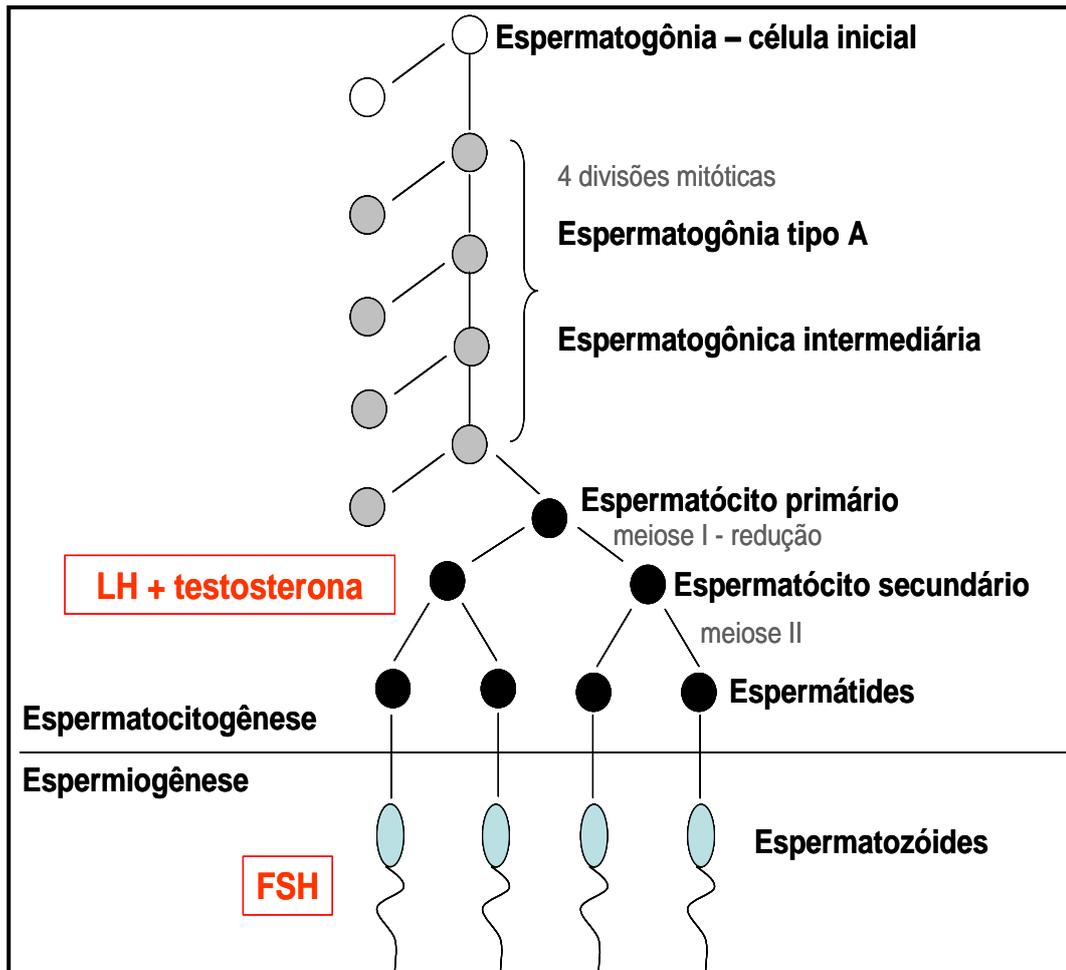


Figura 7. Esquema da espermatogênese indicando a sequência de eventos e hormônios necessários para formação de cada fase celular.

Neste sentido, devido às diversas alterações comportamentais e hormonais promovidas pela redução do tempo de sono, nossa hipótese é que essas alterações no sistema endócrino produzidas pela privação de sono possam, além de prejudicar o CS, também interromper alguma etapa do ciclo espermático em ratos acarretando consequências na fertilidade, especialmente diante da importância de alguns hormônios para formação adequada do espermatozóide.

2 Justificativa

Diversos paradigmas experimentais têm sido propostos no estudo das alterações comportamentais decorrentes da privação de sono aguda ou crônica. Em relação ao sono ou, mais especificamente, sua privação tem sido associada a modificações importantes no comportamento sexual devido à marcantes alterações no perfil hormonal. Estas podem modular a experiência sexual, o comportamento copulatório e ainda acarretar no comprometimento do sistema reprodutor como um todo levando a possíveis prejuízos na perpetuação da espécie.

Apesar das diversas consequências comportamentais e hormonais da privação de sono paradoxal serem bem estabelecidas, os mecanismos relacionados com a reprodução e os efeitos associados aos processos da espermatogênese permanecem desconhecidos. Neste sentido, torna-se relevante o estudo dos efeitos da privação e restrição de sono na função reprodutiva em ratos machos.

3 Objetivos

Objetivo geral

Investigar a influência do treino para aquisição da experiência sexual como um componente importante para o desempenho sexual adequado. Ainda, verificar se os modelos de privação de sono paradoxal e restrição de sono poderiam afetar os parâmetros reprodutivos como o comportamento sexual, espermograma e perfil hormonal.

Objetivos específicos

O objetivo geral exposto acima foi subdividido em 3 proposições:

1. Padronização do treino de comportamento sexual para tornar os animais sexualmente experientes e avaliação das concentrações hormonais após o período de treino (Artigo 1);
2. Avaliar os efeitos da privação e restrição de sono no comportamento sexual, bem como nas concentrações hormonais (Artigo 2);
3. Analisar a qualidade e a concentração espermática após a privação e restrição de sono (Artigo 2).

4 Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar Hannover machos de 90 dias de idade provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina e Biologia - CEDEME. Os animais foram mantidos sob temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com ciclo de claro-escuro de 12 horas (das 7 às 19h) controlado automaticamente e com ração e água à vontade. A limpeza das gaiolas foi feita em dias intercalados para remoção da serragem utilizada para forração. Aproximadamente 10 animais foram utilizados para cada grupo. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos segundo as Normas Internacionais de Pesquisa envolvendo Animais e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (#071/09 - Anexo 1).

4.2 Treino de comportamento sexual

Animais inexperientes podem não apresentar CS. No intuito de evitar qualquer viés durante a avaliação comportamental, todos os ratos passaram por treino de CS a fim de adquirir experiência sexual e assim garantir um padrão semelhante de resposta sexual entre eles.

Os ratos foram colocados por 5 minutos antes do início do teste isoladamente em gaiolas de acrílico (45 cm de diâmetro x 50 cm de altura) para evitar a interferência do comportamento exploratório no CS. Em seguida, foi colocada uma fêmea receptiva artificialmente induzida pela administração por via subcutânea de $10\ \mu\text{g}/0,1\text{ml}$ de estradiol 48 e 24 horas antes do teste, e de $500\ \mu\text{g}/0,1\text{ml}$ de progesterona 4 horas antes do início do teste. Todos os testes foram realizados durante o período escuro (19 às 3 horas) do ciclo claro-escuro.

Para o treino de CS, os animais foram expostos por 30 minutos durante 9 dias intercalados a fêmeas receptivas. O teste foi interrompido quando os ratos

não apresentavam nenhuma atividade durante 15 minutos (Figura 8). Quando os animais apresentavam intromissão, o cronômetro era reiniciado por mais 15 minutos até a ejaculação. Foi considerada a latência máxima (15 minutos) para os animais que não apresentavam ejaculação.



Figura 8. Esquema de treino para adquirir experiência sexual em ratos. TR: treino.

4.3 Drogas

Para a realização dos experimentos de CS foram utilizadas as seguintes drogas (Sigma, St. Louis, EUA) administradas por via subcutânea:

- Estradiol E₂: concentração de 0,1 g/20ml.
- Progesterona P₄: concentração de 0,002 g/20 ml.

ARTIGO 1: Influence of progesterone on sexual performance in male rats (Journal of Sexual Medicine 2010;7:2435-2444).

4.4 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais:

- a) *Naïves*: animais controles (CTRL) mantidos em suas gaiolas de moradia.
- b) *Sexualmente experientes*: animais que foram submetidos ao treino para adquirir experiência sexual.

4.5 Procedimento experimental

Os animais foram submetidos ao treino de CS conforme descrito no item 4.2. Após os 9 dias de treinamento os animais foram distribuídos em 4 grupos de acordo com a frequência ejaculatória: excelente, adequado, baixo ou nenhum desempenho sexual e eutanasiados para coleta de sangue para posterior dosagem hormonal de testosterona e progesterona (Figura 9).

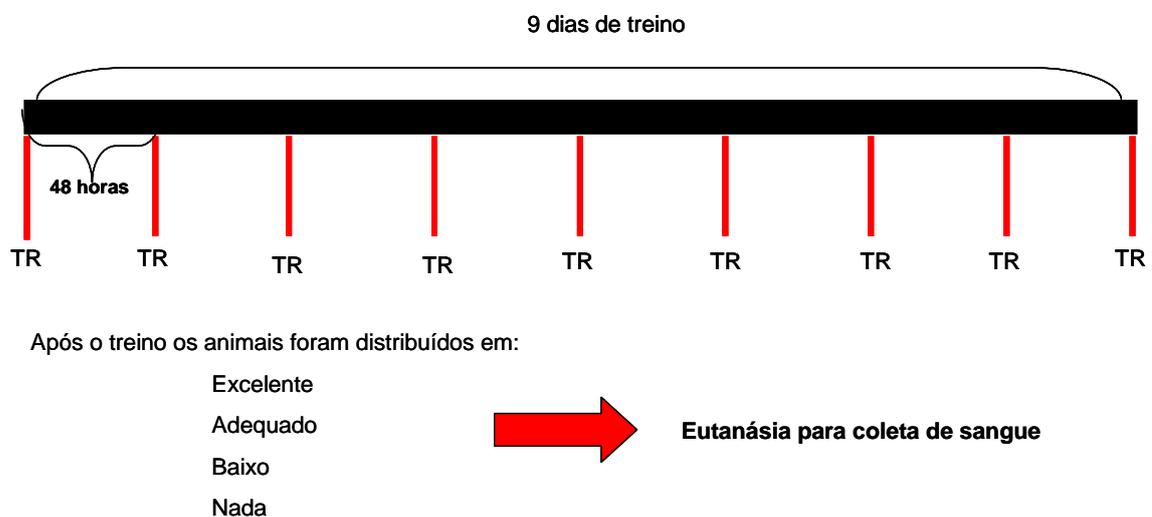


Figura 9. Protocolo experimental utilizado no Artigo 1. TR: treino para adquirir experiência sexual no qual os animais foram expostos à fêmeas receptivas por 15 minutos durante 9 dias intercalados.

4.6 Análise hormonal

Ao final de cada experimento, os animais foram imediatamente eutanasiados pelo método da decapitação em uma sala adjacente. Saliente-se que esse procedimento requer muita experiência e destreza para imobilizar o animal corretamente e precisão no manejo da guilhotina. Então, somente uma pessoa realizou a decapitação no decorrer dos experimentos.

Após a eutanásia dos animais, o sangue foi recolhido em tubos de vidro específicos de acordo com a dosagem hormonal a ser realizada. Tubos sem anticoagulante foram utilizados para a determinação hormonal de testosterona e progesterona. Após a coleta, os tubos foram centrifugados a 3018,4xg por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi pipetado e armazenado em tubos menores a -80°C até a realização dos ensaios que foram realizados por meio da técnica de quimiluminescência (ADVIA-Centaur®). O coeficiente de variação intra-ensaio considerado para testosterona foi de 7,7% e para progesterona foi de 6,5%.

4.7 Análise estatística

Uma vez que os dados de CS apresentaram normalidade, foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan. As avaliações hormonais foram analisadas pelo teste de ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan para comparações entre os grupos. Os valores foram expressos em média \pm erro padrão. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

ARTIGO 2: *The effect of sleep loss on the reproductive function of male rats (submetido).*

4.8 Grupos experimentais

Após o treino de CS os animais com ótimo desempenho sexual 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.

4.9 Procedimento experimental

Após o treino de CS, os animais foram submetidos à PSP por 96 horas ou RS por 21 dias. Imediatamente após o período de PSP/RS foi realizada a avaliação do CS durante 30 minutos, seguida do exame para avaliação do sêmen. Feita a análise do espermograma, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue para dosagens hormonais (Figura 10).

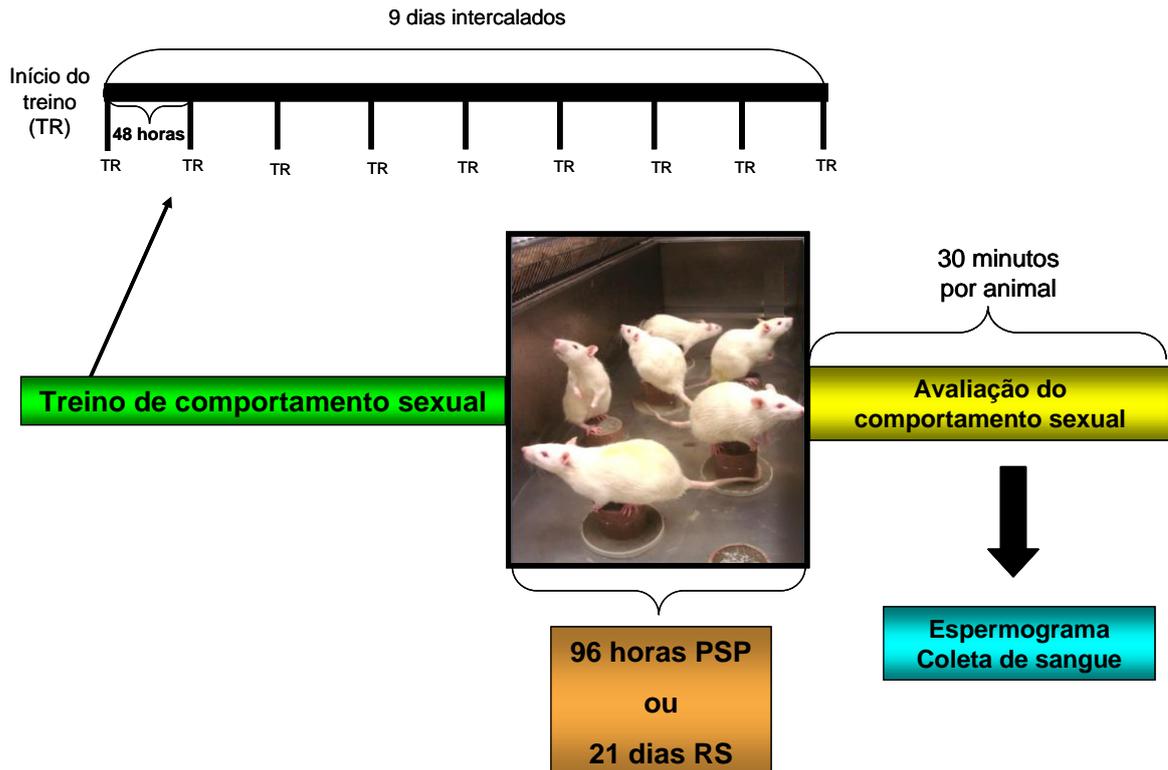


Figura 10. Protocolo experimental utilizado no Artigo 2. TR: treino para adquirir experiência sexual no qual os animais foram expostos à fêmeas receptivas por 15 minutos durante 9 dias intercalados; CS: comportamento sexual; PSP: privação de sono paradoxal; RS: restrição de sono parcial crônica.

4.10 Privação de sono paradoxal

Os animais foram submetidos à PSP durante 96 horas. O método de plataforma múltipla modificada consiste em colocar aproximadamente 10 animais em um tanque (143 x 41 x 30cm) contendo 14 plataformas circulares de 6,5 cm de diâmetro com o nível da água 1 cm abaixo da sua superfície (Figura 11). O número de plataformas maior que o de animais permite que eles possam mover-se de uma para outra, ao contrário da imobilização observada no método de plataforma única. A atonia muscular presente no sono paradoxal faz com que o animal acorde ao encostar o focinho ou, ainda, o corpo inteiro na água.

Um estudo realizado recentemente em nosso laboratório demonstrou que, durante o período de PSP de 96 horas, o método de plataforma múltipla foi capaz de suprimir totalmente o sono paradoxal nos animais (Machado et al., 2004). Portanto, optamos por denominar a técnica de “privação de sono paradoxal”. Durante todo o período de PSP, a sala foi mantida em condições de temperatura constante ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 7 horas da manhã. A água do tanque foi trocada diariamente.



Figura 11. Ratos privados de sono paradoxal pelo método da plataforma múltipla modificada.

4.11 Restrição de sono

Os animais foram submetidos à RS pelo método da plataforma múltipla, como descrito no item anterior. Diariamente, os ratos foram alojados sobre uma plataforma circular em tanque com água durante 18 horas (16:00 às 10:00 horas do dia seguinte). Às 10:00 horas os animais ($n=10$) foram devolvidos para as

gaiolas de moradia (41 x 34 x 17,5cm), onde permaneceram até às 16:00 horas, permitindo assim 6 horas de sono (10:00 às 16:00 horas - Machado et al., 2005) como demonstrado na Figura 12.

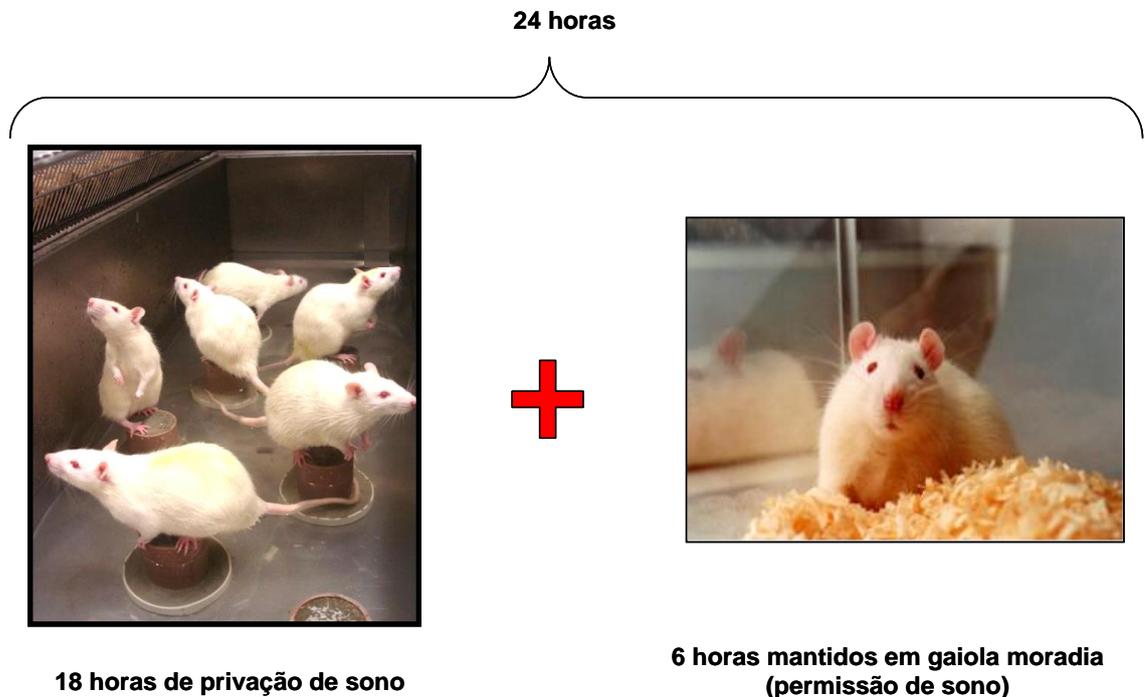


Figura 12. Representação do protocolo de restrição de sono.

4.12 Avaliação do comportamento sexual

Os ratos foram colocados isoladamente por 5 minutos antes do início do teste em gaiolas de acrílico (45 cm de diâmetro x 50 cm de altura) para evitar a interferência do comportamento exploratório no CS. Em seguida, foi colocada uma fêmea receptiva artificialmente induzida pela administração por via subcutânea de 10 µg/0,1ml de estradiol 48 e 24 horas antes do teste, e de 500 µg/0,1ml de progesterona 4 horas antes do início do teste. Todos os testes foram realizados durante o período escuro (19 às 3 horas) do ciclo claro-escuro, como demonstrado na Figura 13.

Os seguintes parâmetros do CS foram avaliados durante os 30 minutos de teste:

- Latência de monta (LM) e de intromissão (LI): consiste no tempo (medido em segundos) que cada animal demora para atingir a primeira monta ou primeira intromissão de cada série copulatória.
- Latência de ejaculação (LE): corresponde ao tempo (em segundos) entre a primeira intromissão até a ejaculação. Foi determinada a latência máxima de avaliação (30 minutos) para os animais que não ejacularam;
- Número de montas (NM) e de intromissões (NI): consiste no número de eventos que ocorreu durante cada série copulatória;
- Número total de montas (NTM) e de intromissões (NTI): corresponde ao número total de montas e intromissões que cada rato apresentou no período total de 30 minutos de avaliação;
- Número total de ejaculações (NTE): corresponde ao número total de ejaculações no período de 30 minutos.
- Intervalo inter-intromissão (III): esse parâmetro é caracterizado pela latência da ejaculação dividida pelo número de intromissões.
- Intervalo inter-copulatório (IIC): caracteriza-se pela latência de ejaculação dividida pelo número de intromissões somado ao número de montas.
- Índice copulatório (IC): foi avaliado pelo número de intromissões dividido pelo número de montas somado ao número de intromissões.

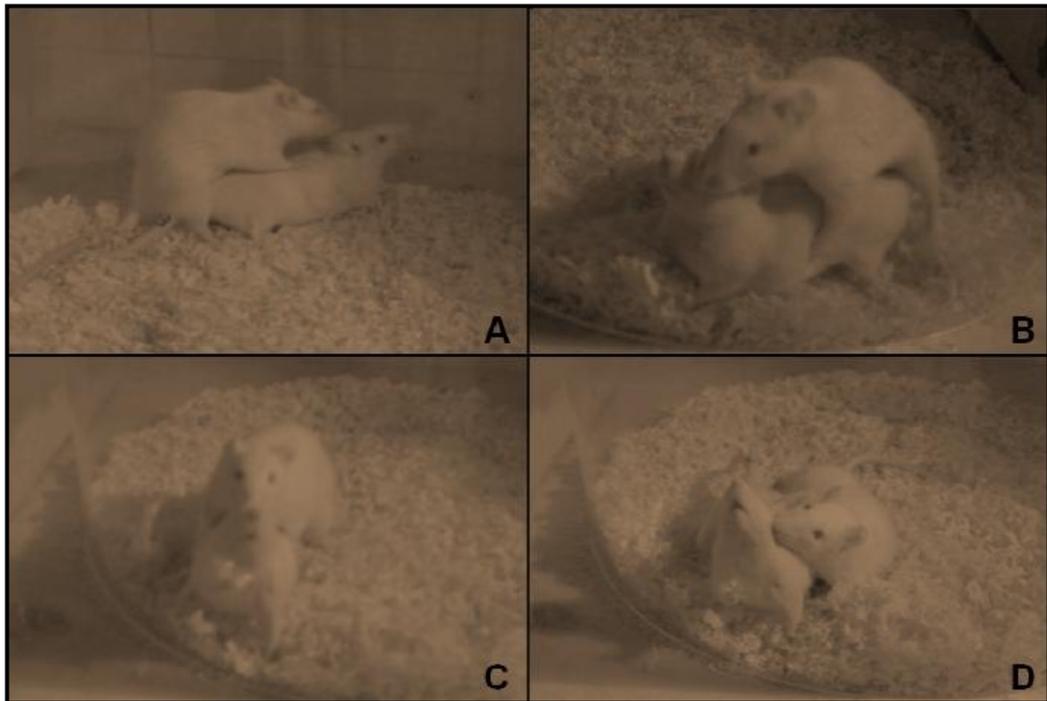


Figura 13. Ilustração de comportamento sexual emitido pelo rato durante **(A) Monta:** ocorre quando o macho se apóia sobre a região pélvica da fêmea sem que haja intromissão do pênis; **(B) Intromissão:** ocorre a penetração do pênis na vagina da rata; **(C-D) Ejaculação:** ocorre após uma sequência de montas e intromissões. É uma continuação da intromissão, porém o rato mantém o pênis na vagina da rata por um tempo maior (1-3 segundos). Esse comportamento consiste no término de uma série ejaculatória do comportamento sexual.

4.13 Espermograma

Imediatamente após o macho ter ejaculado, a fêmea foi eutanasiada para retirada do líquido seminal diretamente dos cornos uterinos. O líquido seminal foi armazenado em tubos a 37°C e foram feitas as seguintes análises microscópicas e macroscópicas (Lucio e Tlachi-López, 2008):

Parâmetros microscópicos

- *Viabilidade espermática:* 10µl de líquido seminal juntamente com 10 µl de corante eosina-nigrosina foram colocados em uma lâmina e

nos possibilitou a contagem em microscópio dos espermatozóides vivos (não-corados) e mortos (corados) (Figura 14A).

- *Concentração espermática*: para medir a concentração dos espermatozóides foi feita uma diluição de 1:100 de 10µl de líquido seminal e 90µl de formalina 10%. Após a diluição, a contagem foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer (Figura 14B).
- *Mobilidade*: foi feita a contagem de 100 espermatozóides e esses classificados quanto ao tipo de movimento: progressivo rápido (A), progressivo lento (B), *in situ* (C) ou parado (D) (Figura 14C).
- *Morfologia*: foi feita a contagem de 100 espermatozóides e esses classificados quanto a morfologia: normal, somente flagelo, somente cabeça ou 2 cabeças (Figura 14D).

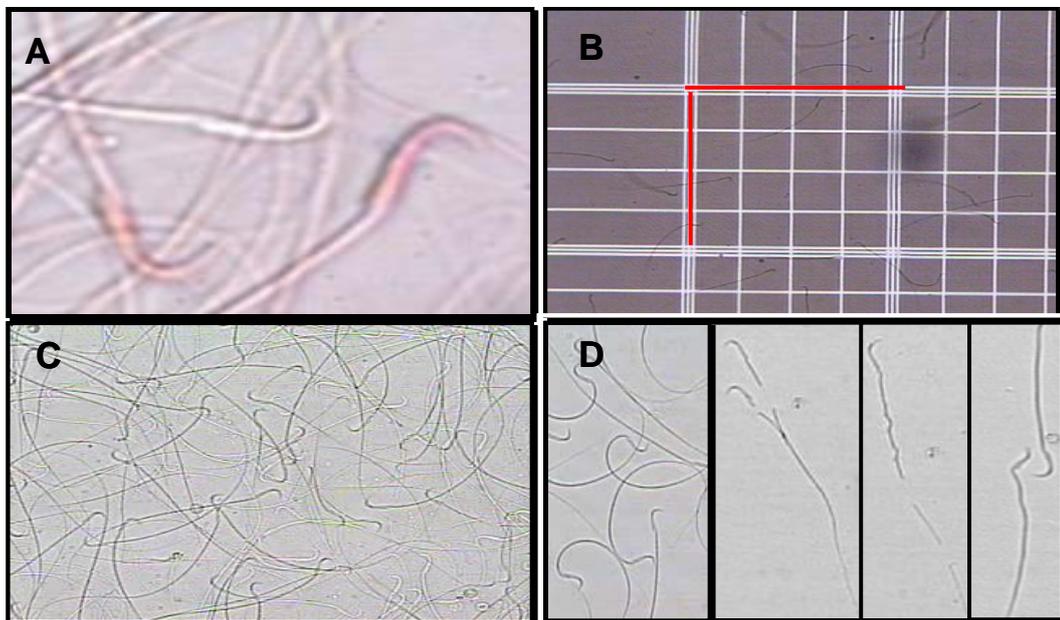


Figura 14. Parâmetros microscópicos analisados no teste de espermograma. **(A)** viabilidade, **(B)** concentração espermática, **(C)** mobilidade e **(D)** normalidade.

Parâmetros macroscópicos

- Dentre os parâmetros macroscópicos foram analisados: cor (amarelo, branco ou transparente), volume e pH do líquido seminal.

4.14 Análise hormonal

Após a eutanásia o sangue foi recolhido em tubos de vidro específicos de acordo com a dosagem hormonal a ser realizada. Após a coleta, os tubos foram centrifugados a 3018.4xg por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi pipetado e armazenado em tubos menores a -80°C até a realização dos ensaios. A concentração hormonal de testosterona (7,7%) e progesterona (6,5%) foi determinada por meio da técnica quimiluminescência (ADVIA-Centaur®). Já as dosagens de FSH e LH (<9,5%) foram realizadas por meio da técnica Multiplex. Essa nova tecnologia Luminex™ xMAP (MAP = Perfil de Múltiplos Analitos, x = sua variável a ser analisada) nos permite a dosagem de múltiplos analitos simultaneamente em um único poço de reação em microplacas envolvendo processo exclusivo. E ainda, outra vantagem é um menor volume (25 µl) de amostras para a realização dos 2 ensaios simultâneos. Com isso, podemos minimizar o custo de um imunoenensaio tradicional de ELISA em aproximadamente 50%.

4.15 Análise estatística

Os dados de CS foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Por não apresentarem os pré-requisitos necessários para o uso de testes paramétricos, foi necessário padronizar os dados utilizando o Escore Z. Posteriormente, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via

seguido do teste *post-hoc* de Tukey quando necessário. Em relação aos resultados hormonais e o espermograma, foi utilizado o teste de ANOVA de uma via seguido do *post-hoc* de Tukey quando necessário. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio-padrão. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

5 Resultados

ARTIGO 1**Influence of Progesterone on Sexual Performance in Male Rats**

Journal of Sexual Medicine 2010;7:2435-2444

Resumo

Tem sido documentado que a experiência copulatória pode melhorar o desempenho sexual em ratos machos. No entanto, as bases hormonais e o número de cópulas para o rato adquirir experiência sexual satisfatória ainda não estão claramente estabelecidos. Neste sentido, o objetivo do presente artigo foi determinar o tempo necessário para que os animais apresentassem um bom desempenho sexual, assim como, avaliar as concentrações hormonais após o treino. Para isso, ratos Wistar Hannover machos foram expostos a presença de fêmeas receptivas durante 9 dias intercalados. Após este protocolo de treino, os animais foram distribuídos em grupos de acordo com a frequência ejaculatória, assim classificados em excelente, adequado, baixo e nenhum desempenho sexual. Também foram avaliadas as concentrações hormonais em todos os grupos que passaram por treino de comportamento sexual. Nossos resultados indicaram que 9 dias de treino não foram suficientes para que alguns animais apresentassem um bom desempenho sexual. Enquanto 42,5% dos animais apresentaram excelente desempenho sexual, 17,5% mostraram um desempenho adequado, 7,5% tiveram baixa atividade e inesperadamente 32,5% dos animais não apresentaram nenhum comportamento. Além disso, após 4 dias de treino os animais com excelente e adequado desempenho apresentaram diminuição da latência para ejaculação quando comparado com o 1º dia de treino. Em relação aos resultados hormonais, os ratos com baixo ou nenhum desempenho apresentaram menores concentrações de progesterona quando comparadas aos animais de excelente/adequado desempenho. A testosterona foi significativamente reduzida nos animais de baixa/nenhuma atividade comparados com os animais de excelente/adequado desempenho. Assim, pode-se concluir que além da testosterona, a progesterona pode ser um fator relevante para um bom desempenho sexual em ratos machos.

Influence of Progesterone on Sexual Performance in Male Rats

Tathiana A. Alvarenga, PhD, Monica L. Andersen, PhD, and Sergio Tufik, PhD

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Department of Psychobiology, R. Napoleão de Barros, 925, V. Clementino 04024-002, São Paulo, SP, Brazil

DOI: 10.1111/j.1743-6109.2010.01851.x

ABSTRACT

Introduction. It has been documented that copulatory experience can alter or improve sexual performance in male rats. However, the hormonal basis and the number of sexual encounters needed for a rat to acquire sufficient performance remains unclear.

Aim. The aim of this study was to examine whether levels of testosterone and progesterone are associated with sexual performance in male rats.

Methods. Adult male Wistar Hannover rats were exposed to a receptive female for 15 minutes every other day for 9 days for acquiring sexual experience.

Main Outcome Measures. After training protocol, rats were scored as low or high sexual performers. Hormonal levels (testosterone and progesterone) were evaluated in both trained and non-trained control groups.

Results. Our results showed that a 9-day training period was not sufficient for some male rats to acquire a good level of sexual performance. While 42.5% of the rats displayed excellent sexual performance during the training sessions, 17.5% showed adequate performance, 7.5% had low sexual activity, and 32.5% of the rats did not display any sexual behaviors whatsoever. Additionally, after 4 days of training, rats with excellent/adequate performance showed a significant decrease in ejaculation latency relative to the first day of training. The rats with low or no sexual activity had lower progesterone levels relative to those displaying the highest sexual performance after 9 days of training. Testosterone, in turn, was also significantly reduced in animals with low/no sexual performance compared with excellent/adequate rats.

Conclusion. In conclusion, progesterone may be a limiting factor to promoting sexual performance in male rats. **Alvarenga TA, Andersen ML, and Tufik S. Influence of progesterone on sexual performance in male rats. J Sex Med 2010;7:2435–2444.**

Key Words. Sexual Experience; Sexual Behavior; Testosterone; Progesterone; Ejaculation; Hormones; Sexual Function in Animal Model; Male Rat

Introduction

It has been reported that copulatory experience can alter sexual performance in male rats [1], and that some rats display low sexual activity in the presence of a receptive female [2–6]. For instance, Chu and co-workers [7] reported that some male rats had a spontaneously low level of motivation and copulatory behavior during the pre-test (first exposure to the female).

Sexual behavior is directed by a sophisticated interplay of steroid hormone actions in the brain. These hormones regulate sexual arousal and the experience of sexual rewards that give rise to expect-

tations of competent sexual activity, sexual desire, arousal, and performance. Among steroid hormones, testosterone has been considered the main candidate for modulating sexual function in male rats. Sexually experienced rats had increased testosterone levels compared with animals that were never exposed to sexual stimuli [8]. In addition to testosterone, estrogen and luteinizing hormone have also been consistently reported to be associated with sexual experience in male rats [9,10]. In particular, Wu and Gore [10] demonstrated that sexual experience changed sex hormone levels in young male rats, leading to higher levels of testosterone and estrogen compared with naïve rats.

These results further strengthen the interaction between sexual behavior and hormonal profile.

Our group has demonstrated a close relationship between progesterone levels and genital reflexes in male rats (for a review, see Ref [11]). Based on the participation of this hormone in the induction of erection in sleep-deprived, castrated rats [12] and on the identification of progesterone-dependent mechanisms that influence neurochemical pathways in copulation [13], we speculated that progesterone may be a relevant hormonal factor for sexual motivation in males. In fact, pretreatment with mifepristone, a progesterone receptor antagonist, significantly reduced the percentage of displayed erections in sleep-deprived rats compared with control rats [14]. Studies of the hormone determinants of genital reflexes induced by paradoxical sleep deprivation (PSD) also demonstrated that these rats presented significantly lower testosterone levels despite a high frequency of erections [15–18].

Recently, Alvarenga et al. [19] demonstrated that progesterone was involved in the sexual performance of male rats. The total number of ejaculations in adult rats subjected to a chronic protocol of food restriction and exposed to PSD was not significantly lower than that of the control group. These animals also displayed an increase in progesterone levels compared with animals that had food *ad libitum* and normal sleep. It follows that the increase in progesterone may have an important role not only in erectile reflex but also in ejaculatory and reproductive mechanisms. Thus, sexual function might be dependent on progesterone secretion in addition to testosterone availability. These data provided further support of the role of progesterone in male sexual motivation.

Although the contribution of experience to the expression of sexual activity has been recognized [20,21], its association with hormone levels has not been fully elucidated. Although recent data showed that progesterone plays a role in sexual motivation, further studies are warranted. For instance, it is not clear how progesterone levels are related to sexual experience. In the present study, we aimed to examine whether levels of progesterone and testosterone were associated with sexual performance in male rats. To conduct this experiment, we subjected male rats to a lengthy training period in which they acquired sexual experience and then scored them as low or high sexual performers. Hormonal levels were evaluated in both trained and non-trained control groups.

Methods

Subjects

Adult male Wistar Hannover rats were bred and raised in the animal facility of the Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) of the Universidade Federal de São Paulo. The animals were housed in a colony maintained at 22°C in a 12:12 hour light-dark cycle (lights on at 07:00 hour) and allowed free access to water and food. The rodents used in this study were maintained and treated in accordance with the National Institute of Health guidelines. All animal procedures were approved by the University's Ethics Committee (CEP N. 09/071).

Sexual Behavior Evaluation

All behavioral observations were performed after the onset of the dark phase (2 hours after the lights were turned off) in a temperature-controlled room by one experienced researcher who was blinded to the different conditions. Sexual behavior tests were done using a Plexiglas cylinder (45 cm diameter) arena. Dim red lights were left on during the dark phase of the light/dark cycle.

The training protocol for acquiring sexual experience consisted of exposing the male rat to a receptive female for 15 minutes every other day for 9 days. Testing was stopped if the male rat did not display any activity for 15 minutes (Figure 1). If the rats expressed intromission behavior, the timer was restarted for 15 more minutes until ejaculation. The maximum latency to ejaculation was therefore 15 minutes (900 sec) on all days of the training. Maximum latency was recorded for animals that did not exhibit any ejaculation.

On each day of training, the male was introduced into the arena 5 minutes before the female. Both latency to first ejaculation and the ejaculation frequency were recorded. The female rats were brought into sexual receptivity by administering estradiol benzoate (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA; 10 µg/0.1 mL sesame oil, sc) 48 and 24 hours before the sexual test, and progesterone (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA; 500 µg/0.1 mL sesame oil, sc) was administered 4 hours prior to the test.

Groups

To better observe the pattern of sexual behavior, animals were classified according to the percentage of ejaculation frequency after 9 days of training (Figure 1A). The rats were distributed into the

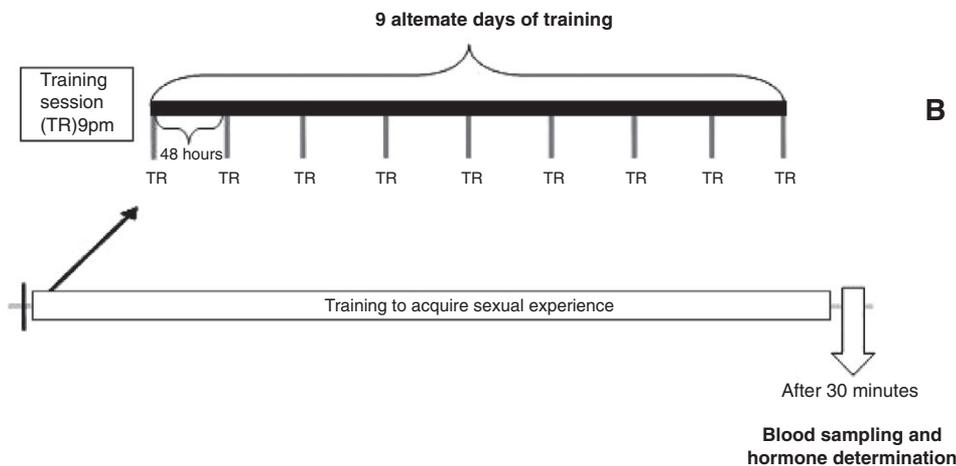
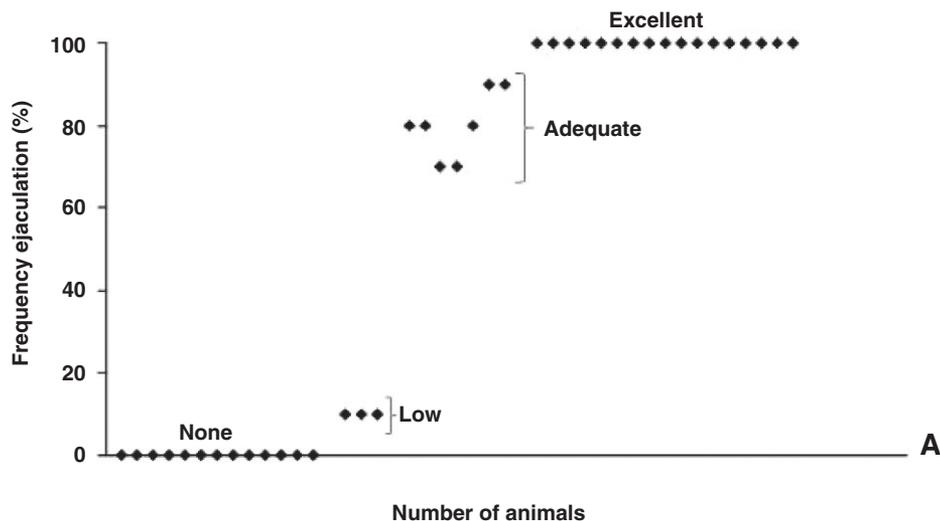


Figure 1 Panel A—Represents the distribution of all animals in relation to the percentage of ejaculatory frequency. Rats were classified in different groups according to this parameter (excellent, adequate, low and none). Panel B—Schematic representation of the protocol. The rats were exposed to 15-minute sexual behavior training sessions on nine alternate days. Thirty minutes after the end of the last day of training, the animals were euthanized and blood was collected for hormone determination.

following groups (no rats displayed ejaculation frequencies between 11 and 69%):

- *Naïve*: animals were not exposed to sexual training (n = 15);
- *Excellent*: animals that showed a 100% ejaculation frequency (n = 17);
- *Adequate*: animals that showed a 70–90% ejaculation frequency (n = 7);
- *Low*: animals that showed a 10% ejaculation frequency (n = 3)
- *None*: animals that did not show sexual behavior at any time during the training (n = 13). See Figure 1A.

Blood Sampling and Hormone Determination

As shown in Figure 1B, rats were taken to an adjacent room and decapitated 30 minutes after the

behavioral test on the 9-day of training. Naïve rats were euthanized at the same time so that hormone levels could be compared between trained and non-trained groups. Blood samples were collected and stored individually. Blood was collected in glass tubes, centrifuged at $3,018.4 \times g$ for 15 minutes at room temperature, and then frozen at -20°C until required. Intra-assay coefficients of variation are given in parentheses. Concentrations of serum testosterone (7.7%) and progesterone (6.5%) were measured by a chemiluminescent enzyme immunoassay (Advia Centaur, Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA).

Statistical Analyses

The sexual behavior data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) for the repeated measures test, followed by the Duncan test. Hormonal data were analyzed using a one-way ANOVA test followed by the Duncan test for comparisons between groups. Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD). The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Sexual Behavior Parameters

Ejaculation Frequency

The ejaculation frequencies shown in Figure 2A were calculated based on the frequency of ejaculation during the nine training days ([number of ejaculations/9 days] \times 100). Figure 2B shows the percentage of rats in each category of sexual performance. Of the 40 total rats, 42.5% displayed high sexual performance, 17.5% were adequate, and 7.5% were low performers; 32.5% of the rats did not show any sexual behavior. Table 1 represents the percentage of animals in different groups (low, adequate and excellent) displaying ejaculation on each training day of the 9-day protocol.

Ejaculation Latency

We selected only 5 animals per group and observed them after days of training, the rats with *excellent* performance had decreased ejaculation latency compared with the *low* performance rats

from the fifth day of training onwards; whereas, the rats with *adequate* performance presented a decrease in ejaculation latency only on the last day of training ($F_{2,10} = 26.75$; $P = 0.001$) (Figure 2C).

In Figure 2D, all rats with *excellent* and *adequate* performance were combined in Group 1 and all rats with *low* or *no* performance in Group 2, because there were no significant differences between Groups 1 and 2. Starting on the third day of the evaluation, Group 1 showed a significant reduction in ejaculation latency compared with Group 2 ($F_{1,38} = 58.28$; $P = 0.001$). Group 1 also had decreased ejaculation latency after the fourth day of training, compared with their own values on days 1, 2 and 3. This reduction in latency persisted until the last day of training. This effect was not observed in Group 2 (Figure 2D).

Hormone Concentrations

Progesterone

Figure 3A shows the effects of sexual experience on progesterone concentrations. The Duncan test indicated that progesterone was significantly higher in Group 1 than in naïve rats ($F_{2,39} = 20.947$; $P = 0.001$). This increase was 3.8-fold higher than that of the naïve group. Interestingly, Group 2 had significantly lower levels than Group 1 ($P < 0.001$).

Testosterone

With regards to testosterone concentrations, the Duncan test revealed that Group 2 showed significantly lower levels relative to Group 1 ($F_{2,39} = 3.94$; $P = 0.02$). As shown in Figure 3B, there were no significant differences among the other groups, despite repeated testing.

Discussion

Our findings illustrate that training is an important component of good sexual performance in male rats. After 9 days of exposure to receptive females, the rats were categorized into *excellent* and *adequate* (Group 1), and *low* and *no* performance (Group 2) groups. Training reduced the latency to first ejaculation in Group 1, which indicates the

Figure 2 Effects of 9 days of training on the acquisition of sexual experience in male rats as measured by ejaculation frequency (panel A), the percentage of subjects that fall into the different categories (panel B), ejaculation latency of different performance levels (low, $n = 3$; adequate and excellent, $n = 5$) (panel C), and ejaculation latencies of Group 1 and Group 2 (panel D). Latencies are expressed as mean \pm standard deviation. Panel C: *significantly different from Group displaying low performance ($P < 0.03$). Panel D: *significantly different from Group 1 ($P < 0.005$); #different from respective previous days ($P < 0.001$).

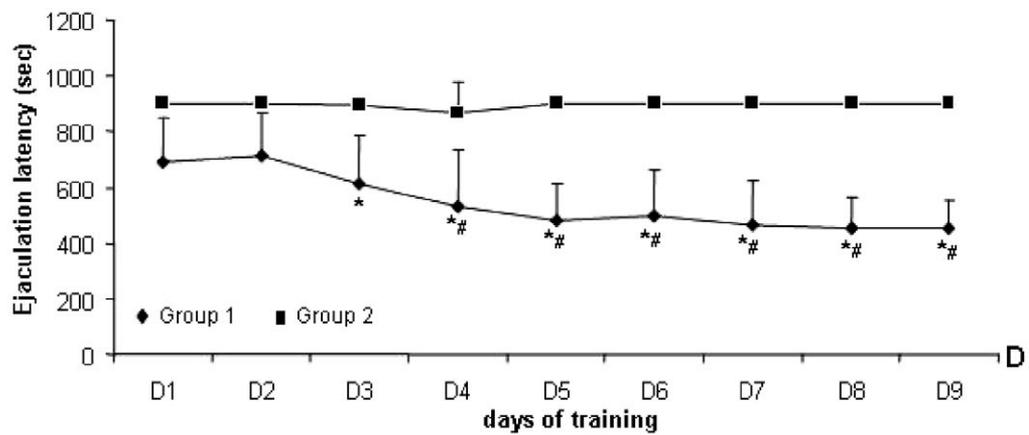
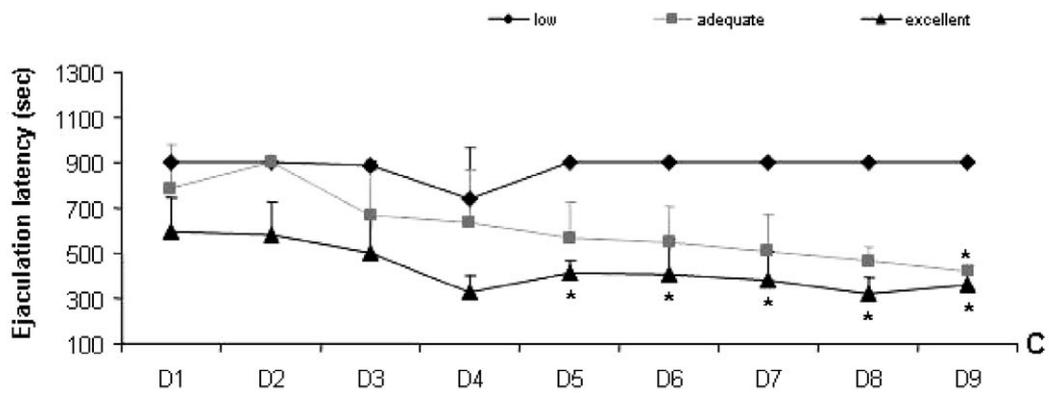
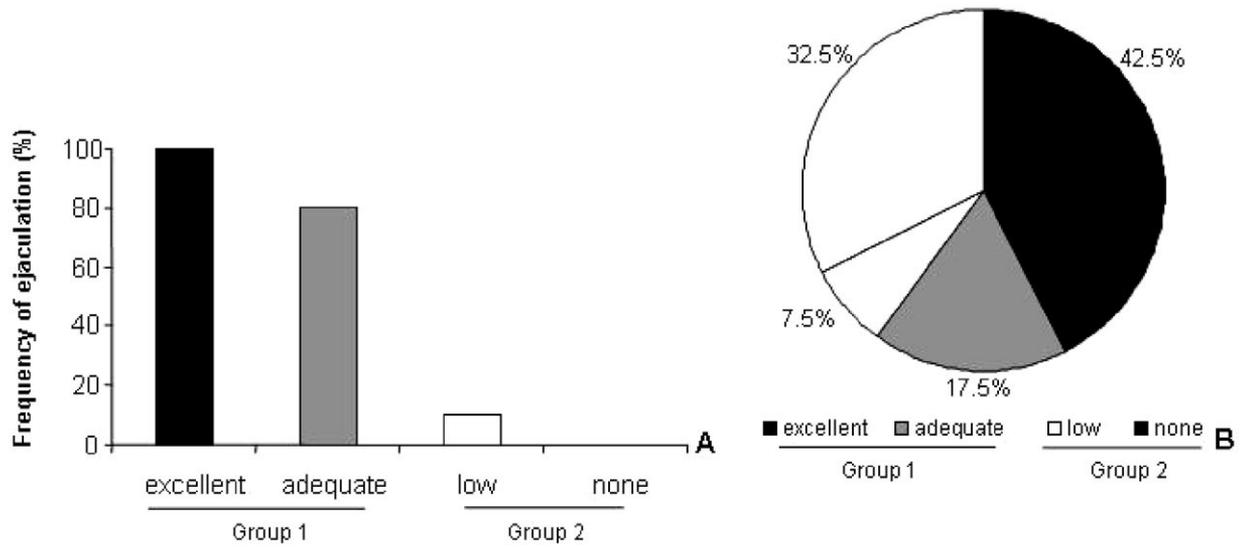


Table 1 Percentage of animals of different groups (low, adequate and excellent) displaying ejaculation on each training day of the 9-day protocol

Days of training	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Low (n = 3)	0	0	33.3	66.6	0	0	0	0	0
Adequate (n = 7)	42.8	14	57.1	85.7	100	100	100	100	100
Excellent (n = 17)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

importance of a standardized time for a good sexual response. Moreover, the results indicate that the acquisition of sexual experience can improve the sexual performance of male rats. While 42.5% of the rats displayed excellent sexual performance throughout the entire observation period, 17.5% improved to an adequate performance, which indicates that sexual experience enhances performance. However, 32.5% of the rats did not display any sexual behaviors. Interestingly, the animals that had better sexual performance also had the highest levels of progesterone. These findings suggest that the high sexual response of Group 1 can be related to a

hypothalamic-adrenal axis activation. In turn, animals that showed low/no performance (Group 2) had significantly reduced testosterone levels relative to the rats of Group 1.

We adopted our protocol because it allowed for standardization of the degree of copulatory activity and avoided possible bias. It would be biased to compare a sexually naïve rat that shows low sexual activity during the training session to another rat that performs well. It is notable that several subjects display sexual behavior on the 3rd and 4th days but not on subsequent days, as shown in Table 1. There were also animals that presented adequate sexual responses up to the 4th day but displayed

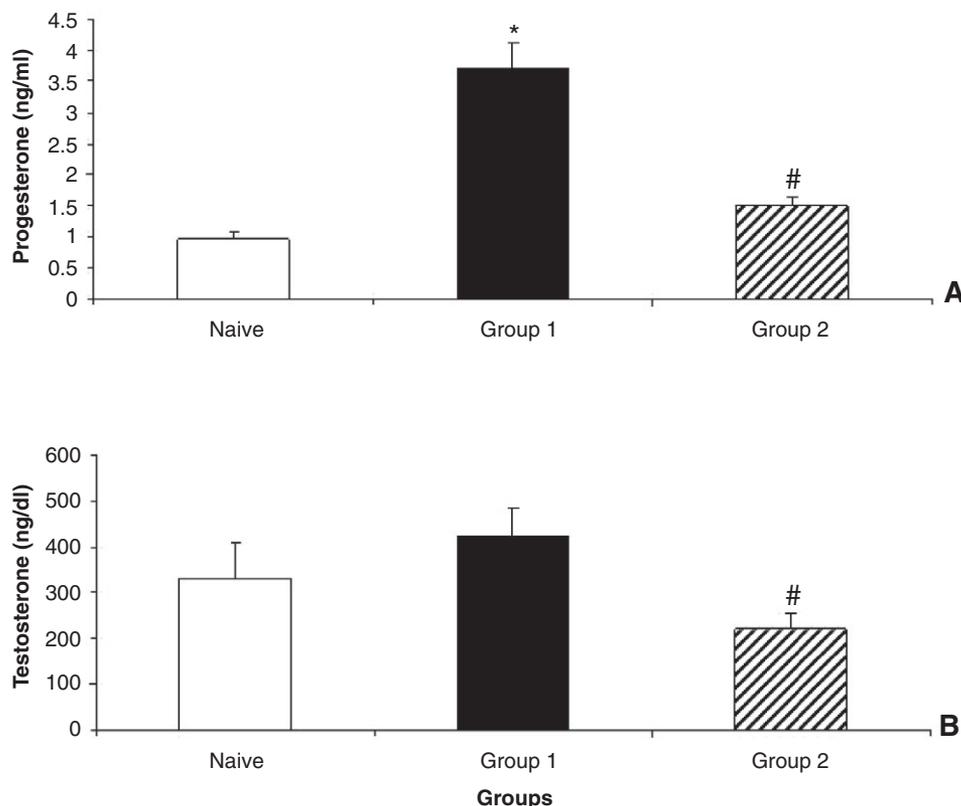


Figure 3 Concentrations of serum progesterone (ng/mL; panel A) and testosterone (ng/dL; panel B) in naïve, Group 1 (excellent and adequate sexual performance), and Group 2 (low/no sexual performance) male rats. Concentrations are represented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). *Significantly different from naïve rats ($P < 0.001$) and #different from Group 1 ($P < 0.001$).

excellent sexual behavior afterwards. Low performance rats, in contrast, did not improve after extended training. These findings corroborate previous studies demonstrating that sexual experience can promote distinct changes in male sexual activity. However, there is not a consensus about this topic. In 2004, Portillo and Paredes [22] demonstrated that 2–3% of their animals did not demonstrate copulatory behavior. Ang and Ngai [23] observed that none of the 100 rats demonstrated sexual behavior. Taken together, there seems to be variation in the proportion of rats not showing copulatory behavior.

We acknowledge that 32.5% is a high proportion of animals with an absence of sexual activity. Pottier and Baran [24] reported that noncopulators suffer from a general behavior syndrome characterized by being less active, less responsive, and different in general arousability. and 55% of the rats were persistent noncopulators during a series of 7 experiments. Compared with experienced animals, the naïve rats that copulate tend to have a longer latency for mounts, intromissions, and ejaculation. Some naïve animals in different species (hamster, gerbil, guinea pig, mouse, ram, and rat) do not copulate or may mount inconstantly during testing. Most of these naïve males never develop stable baseline rates of copulatory behavior and are often discarded [4,6,25–27].

The difference between the studies may be because of the species (rats × mice), strain (Wistar Hannover × Wistar Sprague-Dawley) or behavioral training (time of exposition to female rats). In fact, discrepancies in findings between studies can be because of several factors, such as strain and the protocol of sexual behavior training. In our study, each rat was exposed to a female for a 9-day period; whereas, in Gore's study, the rats had sexual experience 15 times (every other day for 30 days). This suggests that sexual experience is modified according to the duration of sexual stimulation [10]. Because 32.5% did not show any sexual activity during the observation sessions, the 9-day protocol served as a sufficient time lag for selecting good performers and eliminating those that did not display sexual behavior. This allowed us to avoid possible bias during the behavioral evaluation. The speculation that some rats require longer periods to adapt to the test environment so that they can adequately attend to the receptive female [28] is not applicable to this study. The rats used herein did not seem to require more recovery time because they did not present any sexual behavior,

neither mounting nor intromission, for any of the days that were evaluated.

Although other parameters such as mounting, intromission latency and frequency are well established as sexual behavior parameters, we considered the frequency and latency of ejaculation as additional parameters representative of sexual behavior because ejaculation is the endpoint of the copula. Indeed, ejaculation is the most rewarding component of male sexual behavior [9]. Recently, differences in the spinal command of ejaculation in male rats have been reported [29]. That study provides evidence of a neurophysiological difference between the rapid, normal, and sluggish ejaculator, which is expressed as an accelerated expulsion phase in rapid ejaculator rats. Although the complete sequence of integrated pathways, the hormonal basis, and the neurotransmitters necessary for ejaculation have been investigated [30,31], there are still mechanisms not fully addressed.

Testosterone has been identified as the major hormone responsible for male sexual performance, motivation, and attraction (for a review Ref [10,32]). Testosterone typically occur during copulatory behavior and that this hormone can activate transitory motivational and physiological responses that facilitate reproduction in rats [33]. Plasma levels in male rats increased significantly whenever a receptive female was present [34]. Sexually experienced male rats also presented the highest levels of hippocampal testosterone when compared with naïve rats [8]. However, in both studies, the rats were subjected to different durations of sexual activity training with females. In the first study, the rats were submitted to receptive females for a short period of time (1 day). In the second study, rats had a lifetime of sexual experience (approximately 1 year). In our study, testosterone was significantly decreased in the low performance rats (Group 2) relative to the high performance group, suggesting that androgen level is associated with sexual responsiveness. This data demonstrate that testosterone levels did not increase in high performing rats after 9 days of sexual training when compared with naïve rats. These findings are contrary to previous studies that indicated a role for circulating testosterone in sexual performance in rats, thus supporting the important action of androgens in male sexual responses. Further studies have reported sexual experience-related increases of testosterone [8,10]. Wu and Gore [10] observed that experienced groups of male rats had higher serum testosterone than naïve rats. Of note, rats with low sexual activ-

ity did not present decreased plasma testosterone concentrations compared with high-performing rats [35]. Additionally, testosterone levels can be changed by mere exposure to the sight, smell, and sound of an estrous female [25]. In an experiment similar to ours, resting levels of testosterone did not differ between low- and high-activity in males [25]. Collectively, the hormonal profile related to copulation is an issue that warrants further experimentation to clarify the influences that sexual experience can exert on testosterone concentrations and to tease apart further factors involved in the complex cascade of events that underlies copulatory behavior.

Portillo et al. [36] confirmed the hypothesis that the concentration of aromatase activity in the brain is lower in non-copulating males than in copulating males. Because testosterone may be metabolized in the brain through aromatization to estradiol, and the rats of Group 2 had a reduction in testosterone levels, we can assume that this reduction in androgens found in the present study may result in lower levels of estradiol in low performance and non-copulating rats. Estradiol obtained through the regional aromatization of testosterone in the brain is crucial in males for full display of copulatory behavior and partner and olfactory preferences for receptive females [36]. These findings shed light on the understanding of hormonal profiles related to low sexual performance in rats.

Progesterone is a relevant key regulator of the processes involved in the development and maintenance of reproductive function [37]. Progesterone's central role in female reproduction is well documented and a great deal of research has focused on elucidating the neural and endocrine mechanisms of progesterone in females. Limited attention, however, has been directed to its possible role in the function of sexual behavior in males. An early study by Heller et al. [38] reported a decrease in sexual libido in four men receiving progesterone treatment. In the 1970s, progesterone treatment was used to reduce excessive sexual desire [39] and in the treatment of some abnormal sexual behaviors in males [40]. Further physiological experiments indicated that male rats showed daily hormonal variations with a nocturnal decrease in testosterone concentrations, while progesterone was lower in the morning and gradually increased throughout the day [41]. In contrast to human studies, it has been reported that progesterone supplementation in castrated male rats could initiate the full array of sexual behaviors even in the absence of other gonadal steroids [13].

That study verified that testosterone alone did not completely restore typical sexual responses in all castrated males, unless progesterone concentrations were also elevated.

Over the last few years, our group has consistently observed that progesterone influences male genital reflexes displayed by sleep-deprived rats. For instance, replacing progesterone in sleep-deprived, spontaneously hypertensive rats promoted pronounced increases in erection as compared with replacement of testosterone [18]. Pretreatment with mifepristone, a progesterone receptor antagonist, significantly reduced the percentage of rats displaying erections [14]. It is notable that these studies illustrate the effects of progesterone on erection events exclusively. Herein, we are reporting that progesterone also plays a role in male copulatory behavior. Thus, we speculate that progesterone may be a relevant hormonal factor in eliciting male sexual response. With respect to mating behavior, we also found that progesterone was involved in ejaculatory mechanisms in male sleep-deprived rats, because rats that showed normal ejaculation frequencies had higher concentrations of progesterone [19].

Interestingly, we observed in the present study that the group of animals with the highest sexual activity (Group 1) also had increased levels of progesterone in comparison to naïve and low/no sexual performance rats (Group 2). Progesterone was also 3.8-fold increased in Group 1 relative to control naïve animals. These data provide further support for a role of progesterone in male sexual behavior and suggest that good performance is accompanied by high levels of progesterone, which, in turn, can be considered a limiting factor to promoting sexual performance in male rats. In this sense, it might be speculated that the rats require certain levels of progesterone to be able to show sexual behavior. Accordingly, adequate levels of progesterone are necessary for the rats to have excellent performance. Frye et al. [42] speculated that some of progesterone's influences on various behaviors might be because of actions of its 5α -reduced metabolite, 5α -pregnan- 3α -ol- 20 -one.

In summary, this study aimed at investigating how training influenced or improved sexual performance and whether hormones such as testosterone and progesterone might influence this behavior. Regarding the training required for acquiring sexual experience, our study demonstrates that a minimum exposure time to receptive females is necessary for the male to perform well,

though some rats may still not achieve adequate performance after 9 days. In this way, we were able to observe the evolution of sexual behavior day by day. As can be observed in Figure 2C, males become experienced after three to five training sessions. Indeed, the figure depicts that from the fourth day of the training, the animals presented a reduction in ejaculation latency. Of note, Table 1 shows that there are animals that presented sexual behavior on the third and fourth days; however, no sexual activity was displayed after that. Also, some animals presented adequate sexual performance (70–90% ejaculation frequency) up to the fourth day, but presented excellent sexual behavior after the fifth day. Collectively, our data show that when studying male sexual behavior in rats, one should account that not all subjects will show adequate performance (Group 1) and that there are animals that require more sessions (>5) before they can display adequate sexual behavior. Furthermore, we also show that testosterone, which is an important factor for male sexual function, was lower in rats that had low/no sexual activity, while progesterone, which has gained recent attention for its involvement in male sexual behavior, was significantly elevated in the best performers. Our findings provide more evidence that progesterone may have functionally relevant consequences for male sexual function and that this hormone plays a more important role in the control of male sexual behavior than has been commonly thought.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (CEPID #98/14303-3 to ST; #09/01030-5 to T.A.A). Monica L. Andersen and Sergio Tufik are the recipients of a fellowship from CNPq.

Corresponding Author: Monica Andersen, PhD, Psychobiology, Univ Fed Sao Paulo, Rua Napoleao de Barros 925, Sao Paulo, SP, 04024002, Brazil. Tel: 551121490155; Fax: 551155725092; E-mail: mandersen@psicobio.epm.br

Conflict of Interest: None.

References

- Meisel RL, Sachs BD. The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The physiology of reproduction*, Vol. 2, 2nd edition. New York: Raven Press; 1994:3–105.
- Dahlöf LG, Larsson K. Copulatory performances of penile desensitized male rats as a function of prior social and sexual experience. *Behav Biol* 1978;24:492–7.
- Frankel AI. Hormone release during computer-monitored sexual behavior in mature and aged male rats. *Horm Behav* 1981;15:312–20.
- Pfaus JG, Wilkins MF. A novel environment disrupts copulation in sexually naïve but not experienced male rats: Reversal with naloxone. *Physiol Behav* 1995;57:1045–9.
- Bialy M, Rydz M, Kaczmarek L. Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behav Neurosci* 2000;114:983–90.
- Sura A, Overstreet DH, Marson L. Selectively bred male rat lines differ in naïve and experienced sexual behavior. *Physiol Behav* 2001;72:13–20.
- Chu X, Zhavbert ES, Dugina JL, Kheyfets IA, Sergeeva SA, Epstein OI, Agmo A. Sildenafil and a compound stimulating endothelial NO synthase modify sexual incentive motivation and copulatory behavior in male Wistar and Fisher 344 rats. *J Sex Med* 2008;9:2085–99.
- Edinger KL, Frye CA. Sexual experience of male rats influences anxiety-like behavior and androgen levels. *Physiol Behav* 2007;92:443–53.
- Tenk CM, Wilson H, Zhang Q, Pitchers KK, Coolen LM. Sexual reward in male rats: Effects of sexual experience on conditioned place preferences associated with ejaculation and intromissions. *Horm Behav* 2009;55:93–7.
- Wu D, Gore AC. Sexual experience changes sex hormones but not hypothalamic steroid hormone receptor expression in young and middle-aged male rats. *Horm Behav* 2009;56:299–308.
- Andersen ML, Tufik S. Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res Rev* 2006;51:136–43.
- Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Hormone treatment facilitates penile erection in castrated rats after sleep deprivation and cocaine. *J Neuroendocrinol* 2004;16:154–9.
- Witt DM, Young LJ, Crews D. Progesterone modulation of androgen-dependent sexual behavior in male rats. *Physiol Behav* 1995;57:307–13.
- Andersen ML, Tufik S. Effects of progesterone blockade over cocaine-induced genital reflexes of paradoxical sleep deprived male rats. *Horm Behav* 2005;47:477–84.
- Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Does paradoxical sleep deprivation and cocaine induce penile erection and ejaculation in old rats? *Addict Biol* 2002;7:285–90.
- Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Influence of paradoxical sleep deprivation and cocaine on development of spontaneous penile reflexes in rats of different ages. *Brain Res* 2003;968:130–8.
- Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Effects of chronic stress on steroid hormones secretion in male rats. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:791–7.
- Andersen ML, Martins RC, Alvarenga TA, Antunes IB, Papale LA, Tufik S. Progesterone reduces erectile dysfunction in sleep-deprived spontaneously hypertensive rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:1–12.
- Alvarenga TA, Andersen ML, Velázquez-Moctezuma J, Tufik S. Food restriction or sleep deprivation: Which exerts a greater influence on the sexual behavior of male rats? *Behav Brain Res* 2009;202:266–71.
- O'Donohue W, Plaud JJ. The conditioning of human sexual arousal. *Arch Sex Behav* 1994;23:321–44.
- Agmo A. Sexual motivation—An inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav Brain Res* 1999;105:129–50.
- Portillo W, Paredes RG. Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Horm Behav* 2004;46:330–40.

- 23 Ang HH, Ngai TH. Aphrodisiac evaluation in non-copulator male rats after chronic administration of *Eurycoma longifolia* Jack. *Fundam Clin Pharmacol* 2001;15:265–8.
- 24 Pottier JJ, Baran D. A general behavioral syndrome associated with persistent failure to mate in the male laboratory rat. *J Comp Physiol Psychol* 1973;83:499–509.
- 25 Harding CF, Feder HH. Relation between individual differences in sexual behavior and plasma testosterone levels in the guinea pig. *Endocrinology* 1976;98:1198–205.
- 26 Alexander BM, Stellflug JN, Rose JD, Fitzgerald JA, Moss GE. Behavior and endocrine correlates related to exposure of heterosexual, low-performing and male-oriented domestic rams to rams and ewes in estrus. *J Anim Sci* 1999;77:1864–9.
- 27 Clark MM, Galef BG. Why some male Mongolian gerbils may help at the nest: Testosterone, asexuality and alloparenting. *Anim Behav* 2000;59:801–6.
- 28 Kohlert JG, Bloch GJ. Hyperactivity in hyposexual male rats. *Physiol Behav* 1996;59:171–78.
- 29 Borgdorff AJ, Rössler AS, Clément P, Bernabé J, Alexandre L, Giuliano F. Differences in the spinal command of ejaculation in rapid ejaculating rats. *J Sex Med* 2009;6:2197–205.
- 30 Clément P, Pozzato C, Heidbreder C, Alexandre L, Giuliano F, Melotto S. Delay of ejaculation induced by SB-277011, a selective dopamine D3 receptor antagonist, in the rat. *J Sex Med* 2009;6:980–8.
- 31 Carro-Juárez M, Rodríguez-Manzo G. Participation of endogenous opioids in the inhibition of the spinal generator for ejaculation in rats. *J Sex Med* 2009;6:3045–55.
- 32 Sakuma Y. Neural substrates for sexual preference and motivation in the female and male rat. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1129:55–60.
- 33 Nyby JG. Reflexive testosterone release: A model system for studying the nongenomic effects of testosterone upon male behavior. *Front Neuroendocrinol* 2008;29:199–210.
- 34 Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Arteaga-Silva M, Retana-Márquez S. Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats. *Horm Behav* 2006;49:376–82.
- 35 Portillo W, Díaz NF, Retana-Márquez S, Paredes RG. Olfactory, partner preference and Fos expression in the vomeronasal projection pathway of sexually sluggish male rats. *Physiol Behav* 2006;88:389–97.
- 36 Portillo W, Castillo CG, Retana-Márquez S, Roselli CE, Paredes RG. Neuronal activity of aromatase enzyme in non-copulating male rats. *J Neuroendocrinol* 2007;19:139–41.
- 37 Clark JH, Peck EJ Jr. Female sex steroids: Receptors and function. *Monogr Endocrinol* 1979;14:1–245.
- 38 Heller CG, Laidlaw WM, Harvey HT, Nelson WO. Effects of progestational compounds on the reproductive processes of the human male. *Ann N Y Acad Sci* 1958;71:165–72.
- 39 Money J. Use of an androgen-depleting hormone in the treatment of male sex offenders. *J Sex Res* 1970;6:165–72.
- 40 Cooper AJ. Progestogens in the treatment of male sex offenders: A review. *Can J Psychol* 1986;31:73–9.
- 41 Kalra PS, Kalra SP. Circadian periodicities of serum androgens, progesterone, gonadotropins and luteinizing hormone-releasing hormone in male rats: The effects of hypothalamic deafferentation, castration and adrenalectomy. *Endocrinology* 1977;101:1821–7.
- 42 Frye CA, Paris JJ, Rhodes ME. Engaging in paced mating, but neither exploratory, anti-anxiety, nor social behavior, increases 5alpha-reduced progestin concentrations in midbrain, hippocampus, striatum, and cortex. *Reproduction* 2007;133:663–74.

ARTIGO 2**The Effect of Sleep Loss on the Reproductive Function of Male Rats**

Submetido

Resumo

Devido à pressão exercida pela sociedade atual, os indivíduos são impostos a longas jornadas de trabalho ou intensa vida social e conseqüentemente diminuem seu tempo de sono. Essa falta de sono pode levar ao comprometimento de diversas funções do nosso organismo, em especial o funcionamento adequado do sistema endócrino que pode acarretar em prejuízos no comportamento sexual e na função reprodutiva. Neste sentido, o presente estudo avaliou as conseqüências da privação de sono paradoxal (PSP) ou a restrição de sono (RS) nos parâmetros reprodutivos. Ratos Wistar Hannover foram submetidos à PSP durante 96 horas ou a RS por 21 dias consecutivos ou mantidos em gaiola de moradia (CTRL). Em seguida foram avaliados o comportamento sexual, o perfil hormonal e também o espermograma. Nossos resultados indicam que a PSP foi capaz de diminuir significativamente o desempenho sexual. Em relação aos animais que foram expostos à RS, o padrão de cópula foi semelhante aos dos animais CTRL, sem alterações na motivação ou no desempenho sexual. Quanto às alterações hormonais, os ratos submetidos à PSP tiveram uma diminuição significativa das concentrações de testosterona quando comparado com o grupo CTRL. A progesterona, por sua vez, foi semelhante entre os grupos avaliados. As concentrações de FSH e LH também não foram alteradas após os protocolos de PSP e RS. Em relação à análise do sêmen, tanto o grupo PSP 96h quanto o grupo RS 21d apresentaram uma menor viabilidade espermática em relação ao grupo CTRL. No entanto, a diminuição dos espermatozoides vivos foi mais acentuada no grupo PSP do que no grupo RS. Tomados em conjunto, nossos achados sugerem que a falta de sono foi capaz de promover danos na função reprodutiva de ratos machos.

The effect of sleep loss on the reproductive function of male rats

Tathiana A. Alvarenga, Sergio Tufik and Monica L. Andersen

Departamento de Psicobiologia – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), R.

Napoleão de Barros, 925, V. Clementino 04024-002, São Paulo, SP, Brazil

Running title: sleep loss on reproductive function

Corresponding author:

Monica Levy 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: mandersen@psicobio.epm.br

ml.andersen12@gmail.com

Abstract

Reduced sleep time is prevalent in modern society and can lead to various functional outcomes. These impairments significantly impact the endocrine system, and changes in sexual behavior can affect reproductive function. This study aims to evaluate the influence of selective sleep deprivation and long-term sleep restriction on sexual behavior and hormone levels as well as sperm quantity and viability in male rats. Sexually experienced rats were subjected to paradoxical sleep deprivation (PSD) for 96 hours or sleep restriction (SR) for 21 consecutive days. The control group (CTRL) was kept in their home cages throughout the experimental protocol. Sexual behavior was evaluated following the exposure of the PSD or SR paradigm (or the equivalent time period in CTRL rats) and then the hormone and sperm variables were measured. The PSD was able to significantly decrease sexual behavior, but the SR group showed no effect compared to the CTRL group. With respect to their hormones, the PSD rats had a significantly lower testosterone levels compare to CTRL group. Sleep deprivation protocols did not change progesterone, follicle-stimulating hormone (FSH) or luteinizing hormone (LH) in relation to CTRL group. Regarding the semen analysis, both the PSD and SR groups presented a lower sperm viability compared to the CTRL group. However, the decrease in the number of live sperm was larger in the PSD group than in the SR group when compared to the CTRL rats. These findings demonstrate that sleep loss can promote marked changes in the reproductive system and particularly affect sperm viability.

Keywords: sleep deprivation, sleep restriction, sexual behavior, testosterone, progesterone, sperm, reproduction, hormones, male rat.

1. Introduction

Any population residing in an industrial country can experience a sleep deficit. Chronic sleep restriction, which is the root of such deficits, is often associated with the demands of modern life. These include professional, social and domestic obligations that result in a hectic lifestyle and leads to voluntary sleep deprivation. Van Cauter and colleagues (2008) have suggested that an average decrease of up to two hours of sleep per night has occurred over the past five decades in adults and adolescents.

The adverse effects of sleep deprivation (SD) have been well documented and include changes in cognitive performance, weight, metabolic and neurochemical alterations, and an increased risk of cardiovascular disease (D'Almeida et al., 1997; Alvarenga et al., 2008; Tasali et al., 2008; Martins et al., 2010; Perry et al., 2011). Not everyone is adversely affected by SD; the condition has been found to benefit people with depression (see Howland, 2011 for review), improve ambulation in animal models of Parkinson's disease (Andrade et al., 1987) and augment the frequency of spontaneous erection and ejaculation in rats [see Andersen and Tufik (2006) for a review]. Previous studies have also found that paradoxical sleep deprivation (PSD) affects sexual function by promoting genital reflexes (erection and ejaculation), with 50% of the rats studied presenting erection and 20% displayed ejaculation following PSD (Andersen and Tufik, 2002).

Although erection and ejaculation are representatives of fundamental behavior towards sexual engagement, these two responses do not define sexual behavior per se. In order to comprehensively assess sexual behavior one must scrutinize other motivational behaviors expressed as performance in the number of mounts, intromissions and ejaculation. Alvarenga et al. (2009) demonstrated that rats exposed to 96 h of PSD displayed reduced sexual performance, as evidenced by an increase in latency for

intromission initiation and a reduction in the number of intromissions when compared to a control group. These findings indicate that PSD interferes with several regulatory mechanisms of male sexual behavior.

In addition to altering behavior, PSD also has been found to influence sex hormones. Andersen and collaborators (2004a, 2005, 2007) have observed that male rats suffer marked hormonal alterations in a 96 h PSD protocol. These effects include decreases in testosterone and estradiol concentrations as well as increases in progesterone and glucocorticoids.

Pareek and collaborators (2007) have associated a reduction in testosterone concentration with an increase in apoptosis of germinating cells within testicular seminiferous tubules. Given that spermatozooids are formed in the seminiferous tubules, this increase is detrimental to the fertility of affected rats and mice. Luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH) and testosterone are all intimately involved in the process of cellular division and spermatogenesis, which ultimately leads to spermatozoid production (Lo et al., 2004; Sofikitis et al., 2008; Walker, 2009). Additionally, progesterone plays an important role in spermatogenesis, spermatic enablement, acrossome reaction, testosterone biosynthesis (within Leydig cells) and gonadotropin secretion, as well as processes in other body systems (Oettel and Mukhopadhyay, 2004).

Given the evidence above that reduced sleep time promotes behavioral and hormonal alterations, we hypothesize that these endocrine alterations may adversely affect the sexual behavior and interrupt the spermatic cycle in rats. This would be particularly detrimental to the reproductive function when one considers the importance of such hormones in the adequate formation of the spermatozoid.

2. Methods

2.1 Subjects

Adult male Wistar-Hannover rats were bred and raised in the animal facility of the Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) of the Universidade Federal de São Paulo. The animals were housed in a colony with a constant temperature of $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 07:00 h) and free access to water and food. All animals were treated in accordance with the National Institutes of Health guidelines, and all procedures were approved by the University's Ethics Committee (CEP N. 09/071).

2.2 Training and sexual behavior evaluation

Before sexual behavior was evaluated, the rats acquired sexual experience through training. Because sexually inexperienced male rats can display low performance, we followed an established protocol that standardizes the degree of copulatory activity and avoids possible bias (Alvarenga et al., 2010). Twenty-four hours after the last training session, the rats were subjected to PSD for 96 h or SR for 21 days. Sexual behavior was evaluated immediately after these periods.

Training and testing of sexual behavior was performed using a Plexiglas cylinder arena with a 45 cm diameter. Dim red lights shone during the dark phase of the light/dark cycle. A male was introduced into the arena 5 minutes before a female. Sexual receptivity in the female rats was established by administering estradiol benzoate (10 $\mu\text{g}/0.1$ ml of sesame oil, sc, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) 48 and 24 h prior to testing sexual behavior and by administering progesterone 4 h prior (500 $\mu\text{g}/0.1$ ml of sesame oil, sc, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA). Each test of sexual behavior lasted for 30 minutes after the introduction of the female, during which the following variables were

recorded: time to first mount, intromission and ejaculation latencies, total number of mounts (i.e., mounts with pelvic thrusting), intromissions (mounts with pelvic thrusting and penile insertion) and ejaculations. Rate of copulation [number of intromissions/(number of mounts+number of intromissions)], inter-intromission interval (ejaculation latency/number of intromissions) and inter-copulatory interval [ejaculation latency/(number of intromissions+number of mounts)] were also evaluated (Meisel and Sachs, 1994).

2.3 Protocol designs

The animals that displayed excellent performance following sexual training were randomly distributed into the following groups (n=10/group):

- a) CTRL: control rats maintained in their home cage.
- b) PSD: rats submitted to 96 hours of PSD.
- c) SR: rats submitted to 21 days of SR.

2.4 Paradoxical Sleep Deprivation (PSD)

The experimental groups were subjected to 96 hours of PSD using the modified multiple-platform method. The 96 h length of PSD was chosen because previous studies have demonstrated that the most dramatic alterations in behavior (Andersen et al., 2003) and hormone concentrations (Andersen et al., 2005) occur using this period of PSD. A total of 10 rats were placed, one at a time, inside a tiled water tank (143 x 41 x 30 cm) containing 14 circular platforms (each 6.5 cm in diameter) with the water level within 1 cm of the upper surface. The rats could move within the tank by jumping from one platform to another. When they reached the paradoxical phase of sleep, muscle atonia caused them to fall into the water and awaken. Throughout the study, the experimental room was maintained at a controlled temperature ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) with a 12 h light/dark cycle (lights on at

07:00 h and off at 19:00 h). The rats had free access to food and water located on a grid on top of the tank. The water in the tank was changed daily during the PSD period. All animals began their PSD period at the same time as a dark phase of the light-dark cycle (19:00 h). Because we elected not to invert the light-dark cycle, the rats were trained and tested during a dark phase.

2.5 Sleep Restriction (SR)

This protocol was based on the same technique used in the PSD condition. The difference in the SR protocol was that rats were kept on the platforms for 18 h (beginning at 16:00) and were allowed to sleep for 6 h (from 10:00-16:00) every day for 21 days, which partially compensates for sleep loss (Machado et al., 2005). The time interval 10:00-16:00 was chosen because it is when paradoxical sleep is at its highest.

2.6 Sperm Evaluation

Immediately following male ejaculation, the female was euthanized, and the seminal fluid was directly removed from the uterine horns. Seminal fluid was stored in Eppendorf tubes at 37°C and subjected to microscopic and macroscopic analysis.

2.6.1 Microscopic Analysis

Sperm Viability - Seminal fluid (10µl) was placed on a slide with eosin-nigrosin dye (10µl), which allowed us to count the number of live (non-stained) and dead sperm (stained). The dye was prepared in the following way: 1) Eosin (1g) was diluted in distilled water (100ml); 2) Nigrosin (5g) and sodium citrate (2.9g) were added; 3) The dye was filtered and stored in amber bottles.

Sperm Concentration - A 1:100 dilution of seminal fluid (10 μ l) and 10% formalin (90 μ l) was used to measure the concentration of sperm. After dilution, the count was performed with the aid of a Neubauer chamber.

Sperm Mobility - One hundred sperm were classified according to type of movement: fast progressive, slow progressive, *in situ* or quit.

Morphology - One hundred sperm were classified according to morphology: normal, only a tail, only a head or 2 heads.

2.6.2 Macroscopic Analysis

The following macroscopic variables of seminal fluid were examined: color (yellow, white or transparent), volume and pH level.

2.7 Blood sampling and hormone determination

Immediately after behavioral testing, the all rats from the CTRL, PSD and SR groups were taken to an adjacent room and decapitated. Blood samples were collected and stored individually. Blood was collected in glass tubes and centrifuged at 3018.4 x g for 15 minutes at room temperature and then frozen at -20°C until assayed. Serum testosterone [Intra-assay coefficient of variation (ICV)=7.7%] and progesterone (ICV=6.5%) were measured by a chemiluminescent enzyme immunoassay (Advia Centaur, Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA). Plasma luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) (ICV=9.9%) were measured using Multiplex/Luminex technology (Millipore, Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

2.8 Statistical analyses

Data of CS were assessed for normality and homogeneity using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Why not make the necessary prerequisites for the use of parametric tests, it was necessary to standardize the data using Z score. Subsequently, was used a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey *post hoc* when needed. Regarding the hormonal and semen data were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test to compare individual group pairs. Values are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Sexual behavior parameters

No significant difference was found in the mount parameters, which is a measure of motivation ($p > 0.2$). Instead, PSD rats had a longer latency to first intromission compared to the CTRL and SR groups ($p < 0.002$ and $p < 0.003$ respectively, see Figure 1B). Moreover, PSD rats displayed a significantly decrease in number of intromission in relation to CTRL and SR groups ($p < 0.03$ and $p < 0.009$, Figure 2B). In addition, PSD rats displayed a significantly greater reduction total number of intromissions ($p < 0.03$ and $p < 0.002$, Figure 3B) and total number of ejaculations ($p < 0.001$, Figure 3C) compared to CTRL and SR rats. The SR group showed no significant differences from the CTRL group on any measure of sexual behavior.

Only the PSD group showed a significant increase in inter-copulatory ($p < 0.003$), inter-intromission interval ($p < 0.007$ and $p < 0.02$) and copulatory rate ($p < 0.007$ and $p < 0.02$) compared to the CTRL and SR groups (Table 1). The SR group showed a similar rate and similar intervals compared to the CTRL group.

3.2 Hormone concentrations

3.2.1 Testosterone

The ANOVA following the Tukey test revealed a significant decrease (45%) in testosterone concentration after PSD compared to the CTRL group ($p < 0.01$, Figure 4A). There were no other significant differences.

3.2.2 Progesterone

Figure 4B shows the effects of PSD and SR on progesterone levels. The ANOVA revealed no significant difference among the groups; both sleep-deprived groups (PSD and SR) were similar to the CTRL group ($p > 0.05$).

3.2.2 Luteinizing hormone (LH) and Follicle-stimulating hormone (FSH)

As shown in Figure 4C and D, FSH and LH concentrations were not significantly changed in either the PSD or SR groups as compared to CTRL animals ($p > 0.05$).

3.3 Semen analysis

3.3.1 Microscopic variables - sperm concentration, sperm viability and mobility

No significant differences in sperm concentration were observed among the CTRL, PSD and SR groups. However, both the PSD and SR groups showed significantly fewer spermatozoa with fast movements compared to the CTRL group ($p < 0.01$, Table 2). Importantly, sperm viability was 50% lower in the PSD group than in the CTRL group ($p < 0.01$). The SR group also had significantly lower sperm viability (15%) compared to the CTRL group ($p < 0.01$, Figure 5).

3.3.2 Macroscopic parameters – semen volume and pH

No significant differences were observed in the volume and pH of seminal fluid of the CTRL, PSD and SR groups (Table 2). In particular, the semen volume was 50% lower in PSD rats compared to CTRL and SR groups, but the difference did not reach statistical significance.

4. Discussion

Sleep reduction is ubiquitous in modern society and may lead to detrimental effects on several body functions, but the endocrine system is particularly vulnerable. Such adverse effects may then impair sexual behavior and, consequently, reproductive function. The purpose of the present investigation was to assess the consequences of SD on reproductive variables. Our results indicate that 96 h of PSD significantly reduced sexual performance in sexually active rats. Rats submitted to 21 days of SR did not show a significant impairment in sexual behavior compared to CTRL rats. In terms of hormones, the PSD group showed a reduction in testosterone, but not progesterone, compared to the CTRL group. Similarly, LH and FSH were not changed by SD protocols. Semen analysis indicated lower spermatid viability in the PSD and SR groups relative to the CTRL group (50% and 15%, respectively).

The aim was to further understand the complex interactions underlying the regulation of sexual behavior in rodents. It has been previously demonstrated the effect of SD on erectile function, in that SD facilitates genital reflexes in young and aged rats (Andersen et al., 2004b, 2005, 2007). More recently, Alvarenga et al., (2010) have observed that the effects of sexual experience, in particular, may modulate the sexual performance and hormonal profile of male rats. Sexual experience improved sexual performance and could distinguish between animals that had excellent sexual performance

and those that had poor sexual performance. Additionally, rats with excellent sexual performance had a higher progesterone concentration, which suggests a role for endocrine function in male sexual behavior.

Here we have demonstrated that 96 h of PSD hampers sexual behavior in male rats that previously had excellent sexual behavior. This was reflected in an increased latency to initiate intromission behavior and a reduced number of intromissions and ejaculations, which previous findings have shown to represent lower sexual performance (Alvarenga et al., 2009). However, when the SR period was lengthened in an attempt to minimize chronic sleep debt, we found no significant alteration in motivation or sexual performance. This response may have been influenced by the action of sex hormones given that after 21 days of SR, these rats not only maintained their progesterone concentration (as did CTRL and PSD rats), but also maintained their testosterone concentration. Previously, it has been demonstrated that rats that had acquired sexual experience through training showed excellent sexual performance and experienced a surge of progesterone, which indicates that it is required for a satisfactory sexual response in males. In the present study, we observed no alteration of progesterone and speculate that these subjects had high concentrations of progesterone (promoted by sexual experience) prior to SD protocols and that, therefore, it could not increase further, which is supported by the fact that PSD markedly increases progesterone (Andersen et al., 2004a, 2005). Progesterone participates in testosterone biosynthesis within Leydig cells (Oettel and Mukhopadhyay, 2004) and PSD is also known to reduce testosterone concentrations (Andersen and Tufik, 2008), which may be caused by the metabolization of progesterone into androstenedione and would explain the rise in progesterone observed in the PSD group. In this sense, there seems to be an ideal balance between testosterone and progesterone that is required for an adequate response to sexual behavior.

Until now, no study has investigated the effect of SD on spermatozoid formation. Our findings indicate that sleep loss can cause an impairment of reproductive function, as evidenced here by reduced spermatic viability. The PSD group showed a 50% decrease of live spermatozoids, and the SR groups showed a 15% less when compared to the CTRL group, which we hypothesize was due to a disruption in the maintenance of the spermatic cycle (Sofikitis et al., 2008; Walker, 2009) by a decline in testosterone (Andersen et al., 2004ab, 2005; Alvarenga et al., 2009). However, although the PSD group showed a testosterone reduction, the SR group did not; therefore, we cannot definitively conclude that the alteration in spermatic viability in the PSD group was a consequence of their testosterone reduction.

Hormones such as LH and FSH can be influenced by both a sleep deficit and stress. In humans, Nindl and collaborators (2006) have reported that following a period of stress (in this case, military training), there is a surge in LH, but FSH is unaltered, which is also true for partial SD (Baumgartner et al., 1993). It is known that gonadotropic hormones, such as FSH, are responsible for the initialization of spermatogenesis and that LH is the primordial stimulant for testosterone secretion, which also participates in the process. Given that testosterone potentiates the action of FSH (Mclachlan et al., 1995; Singh and Handelsman, 1996; Sousa et al., 2002) and that SD strongly diminishes testosterone, it could be suggested that SD also reduces FSH action, which impairs spermatic viability. However, we showed no significant FSH or LH alteration after PSD or SR, which suggests that impaired spermatic viability, is not caused by direct variation in these hormone concentrations.

The rat's spermatic cycle lasts approximately 56 days; therefore, the spermatozoid was formed prior to the implementation of our PSD and SR protocols, and the damage may have been a result of the environment in which the spermatozoid was stored or

travelled through prior to ejaculation. A morphological alteration in the prostate, epididium, or testicle could compromise the spermatozoid after its formation. Additionally, spermatozoids are extremely vulnerable to heat variation and their conservation requires an ideal body temperature; however, animals subjected to PSD have been shown to lose the ability to control their body temperature, presenting hyperthermia (Seabra and Tufik, 1993; Palma et al., 2009). Therefore, the alteration of a physiological function such as body-temperature control could be responsible for the decrease in spermatic viability that we observed. However, this is the first study to investigate the effects of sleep loss on male fertility and the exact mechanism of this effect cannot be determined from these data.

Sexual behavior depends on the interaction of several factors within a complex cascade of chemical events involving hormones and environmental context. The present study demonstrates that a lack of sleep is detrimental to sexual behavior and reproduction, the latter of which is clearly reflected in the reduction of spermatic viability. Such findings draw our attention to previously unknown consequences of SD and may be a harbinger of consequences yet to be discovered. Further, the detrimental effects of sleep deficits on male fertility may ultimately have a consequence on the reproductive function.

5. References

- Alvarenga TA, Patti CL, Andersen ML, Silva RH, Calzavara MB, Lopez GB, et al. Paradoxical sleep deprivation impairs acquisition, consolidation, and retrieval of a discriminative avoidance task in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 2008;90:624-632.
- Alvarenga TA, Andersen ML, Velazquez-Moctezuma J, Tufik S. Food restriction or sleep deprivation: which exerts a greater influence on the sexual behaviour of male rats? *Behav Brain Res*, 2009;202:266-271.
- Alvarenga TA, Andersen ML, Tufik S. Influence of progesterone on sexual performance in male rats. *J Sex Med*, 2010;7:2435-444.
- Andersen ML, Tufik S. Distinct effects of paradoxical sleep deprivation and cocaine administration on sexual behaviour in male rats. *Addict Biol*, 2002;7:251-253.
- Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Cocaine-induced genital reflexes during paradoxical sleep and recovery. *Physiol Behav*, 2003;78:255-259.
- Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Hormone treatment facilitates penile erection in castrated rats after sleep deprivation and cocaine. *J Neuroendocrinol*, 2004a;16:154-159.
- Andersen ML, Bignotto M, Papale LA, Tufik S. Age-related effects on genital reflexes induced by paradoxical sleep deprivation and cocaine in rats. *Exp Gerontol*, 2004b;39:233-237.
- Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res*, 2005;14:83-90.
- Andersen ML, Tufik S. Does male sexual behaviour require progesterone. *Brain Res Reviews*, 2006;51:136-143.
- Andersen ML, Martins RC, Alvarenga TA, Antunes IB, Papale LA, Tufik S. Progesterone reduces erectile dysfunction in sleep-deprived spontaneously hypertensive rats. *Reprod Biol Endocrinol*, 2007;5:7.
- Andersen ML, Tufik S. The effects of testosterone on sleep and sleep-disordered breathing in men: its bidirectional interaction with erectile function. *Sleep Med Rev*, 2008;5:365-379.
- Andrade LA, Lima JG, Tufik S, Bertolucci PH, Carlini EA. REM sleep deprivation in an experimental model of Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr*, 1987;45:217-223.

- Baumgartner A, Dietzel M, Saletu B, Wolf R, Campos-Barros A, Gräf KJ, Kürten I, Mannsmann U. Influence of partial sleep deprivation on the secretion of thyrotropin, thyroid hormones, growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and estradiol in healthy young women. *Psychiatry Res*, 1993;48:153-178.
- D'Almeida V, Hipólido DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira VB, Tufik S. Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett*, 1997;235:25-28.
- Howland RH. Sleep interventions for the treatment of depression. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*, 2011;49:17-20.
- Lo KC, Lei Z, Rao ChV, Beck J, Lamb DJ. De novo testosterone production in luteinizing hormone receptor knockout mice after transplantation of leydig stem cells. *Endocrinology*, 2004;145:4011-4015.
- Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. *Behav Brain Res*, 2005;160:356-364.
- Martins PJ, Marques MS, Tufik S, D'Almeida V. Orexin activation precedes increased NPY expression, hyperphagia, and metabolic changes in response to sleep deprivation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010;298:E726-734.
- Meisel RL, Sachs BD. The physiology of male sexual behavior. In: E. Knobil and J.D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd Edn., Vol. 2, Raven Press, New York, 1994, pp. 3-105.
- McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM, de Kretser DM. Hormonal control of spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 1995;6:95-101.
- Nindl BC, Rarick KR, Castellani JW, Tuckow AP, Patton JF, Young AJ, Montain SJ. Altered secretion of growth hormone and luteinizing hormone after 84 h of sustained physical exertion superimposed on caloric and sleep restriction. *J Appl Physiol*, 2006;100:120-128.
- Oettel M, Mukhopadhyay AK. Progesterone: the forgotten hormone in men? *Aging Male*, 2004;7:236-257.
- Palma BD, Nobrega JN, Gomes VL, Esumi LA, Seabra ML, Tufik S, Hipolide DC. Prostaglandin involvement in hyperthermia induced by sleep deprivation: a pharmacological and autoradiographic study. *Life Sci*, 2009;84:278-281.

- Pareek TK, Joshi AR, Sanyal A, Dighe RR. Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis*, 2007;12:1085-1100.
- Perry JC, Bergamaschi CT, Campos RR, Andersen ML, Montano N, Casarini DE, Tufik S. Sympathetic and angiotensinergic responses mediated by paradoxical sleep loss in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2011; *in press*.
- Seabra Mde L, Tufik S. Sodium diclofenac inhibits hyperthermia induced by paradoxical sleep deprivation: the possible participation of prostaglandins. *Physiol Behav*, 1993;54:923-926.
- Singh J, Handelsman DJ. The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. *J Androl*, 1996;17:382-393.
- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008;109:323-330.
- Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Ferraz L, Teixeira da Silva J, et al. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum Reprod*, 2002;17:1800-1810.
- Van Cauter E, Spiegel K, Tasali E, Leproult R. Metabolic consequences of sleep and sleep loss. *Sleep Med*, 2008;9:S23-28.
- Walker WH. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids*, 2009;74:602-607.

Figure Captions

Figure 1. The effect of paradoxical sleep deprivation (PSD) and sleep restriction (SR) on (A) latency of mount, (B) intromission and (C) ejaculation. These latencies are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of 9-10 rats per group. *Denotes a significant difference ($p < 0.002$) compared to a control (CTRL) group and ¥ denotes a significant difference ($p < 0.003$) compared to the SR group.

Figure 2. The effect of paradoxical sleep deprivation (PSD) and sleep restriction (SR) on (A) the number of mounts and (B) intromission, which are expressed as the mean \pm standard error of the mean SEM. *Denotes a significant difference ($p < 0.03$) compared to a control (CTRL) group and ¥ denotes a significant difference ($p < 0.009$) compared to the SR group.

Figure 3. The effect of paradoxical sleep deprivation (PSD) and sleep restriction (SR) during the complete sexual behavioral test on (A) the total number of mounts, (B) intromissions and (C) ejaculation. *Denotes a significant difference ($p < 0.03$) compared to a control (CTRL) group and ¥ denotes a significant difference ($p < 0.002$) compared to the SR group.

Figure 4. The concentration of (A) serum testosterone and (B) progesterone, and (C) plasma-luteinizing hormone (LH) and (D) follicle-stimulating hormone (FSH) in the control (CTRL), paradoxical sleep deprivation (PSD) and sleep restriction (SR) groups of male rats. Concentrations are given as the mean \pm SEM. *Denotes a significant ($p < 0.01$) difference compared to a control (CTRL) group.

Figure 5. The effect of sleep loss on sperm viability (percentage of live sperm). *Denotes a significant difference ($p < 0.01$) compared to a control (CTRL) group.

Table 1. The effect of paradoxical sleep deprivation (PSD) and sleep restriction (SR) on inter-copulatory interval, inter-intromission interval and copulatory rate. *Denotes a significant difference ($p < 0.007$) compared to a control (CTRL) group and [‡]denotes a significant difference ($p < 0.02$) compared to the SR group.

Table 2. The effect of paradoxical sleep deprivation (PSD) and sleep restriction (SR) on seminal sperm concentration, pH, volume and mobility according to type of movement: (A) fast progressive, (B) slow progressive, (C) *in situ* or (D) quit. *Denotes a significant difference ($p < 0.01$) compared to a control (CTRL) group.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the invaluable assistance of Renata Mazaro-Costa, Marina Aguiar and Camila Hirotsu. This work was supported by grants from Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) and FAPESP (CEPID #98/14303-3 to ST, #09/01030-5 to TAA, and #09/14206-4 to MLA). M. L. Andersen and S. Tufik are recipients of CNPq fellowship.

Figure 1

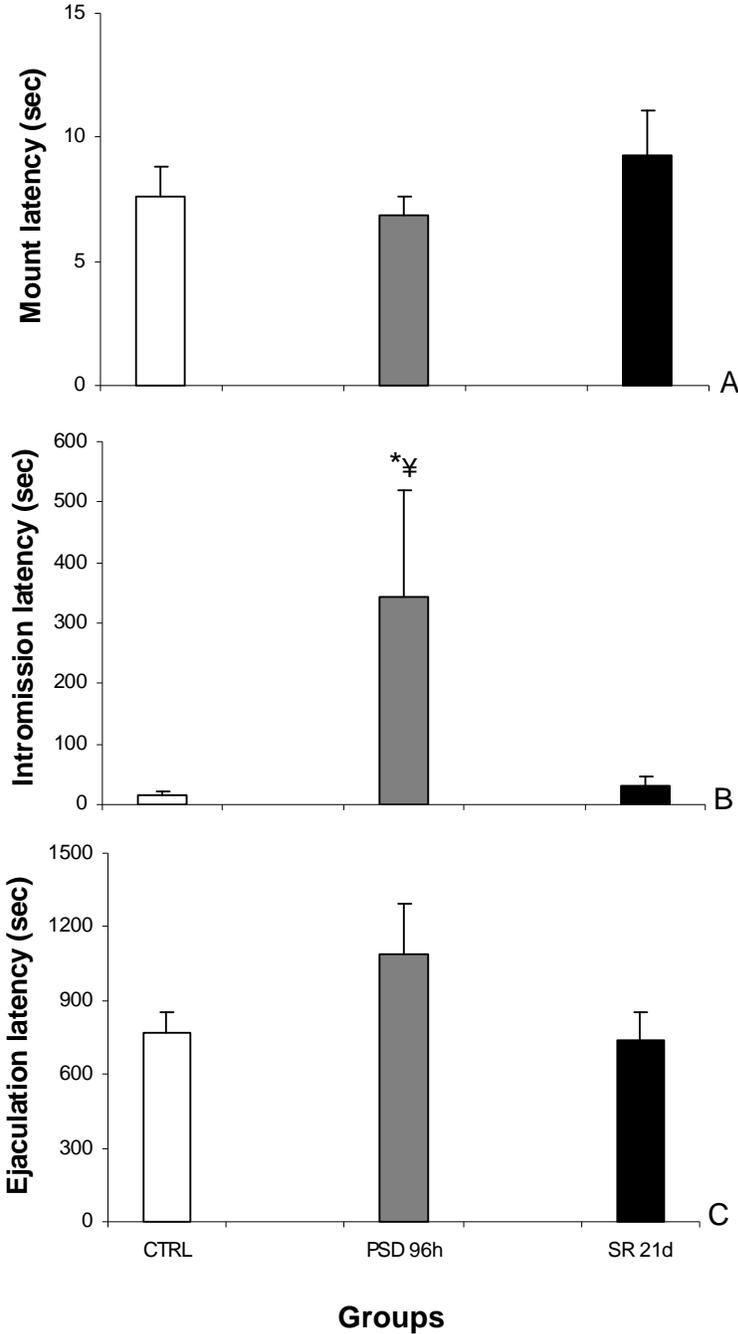


Figure 2

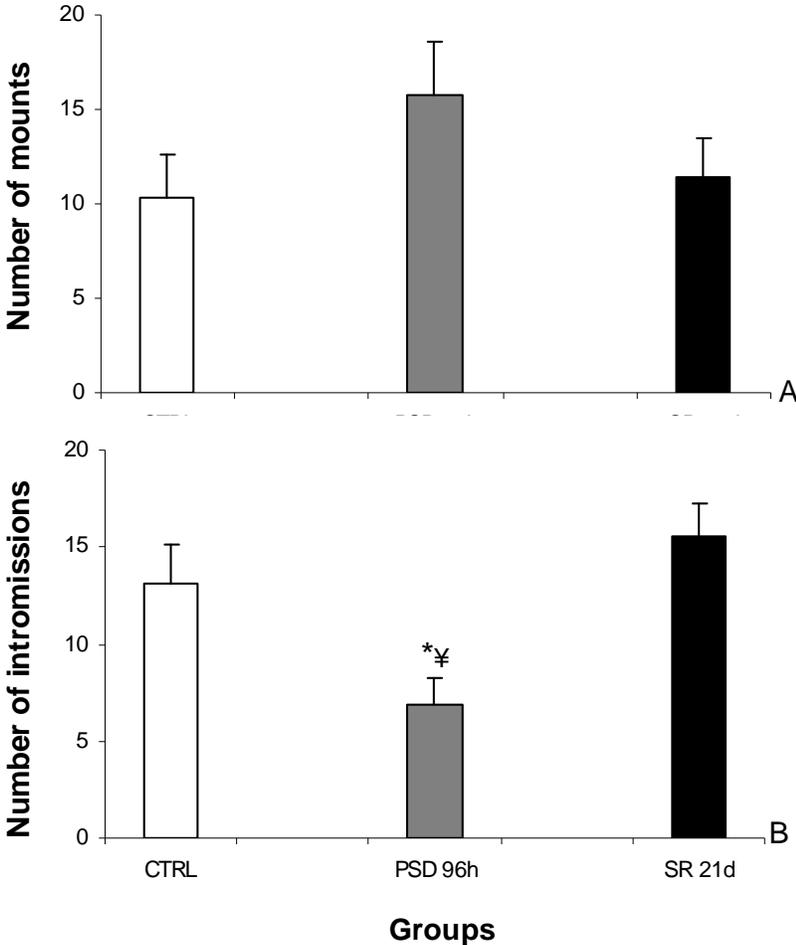


Figure 3

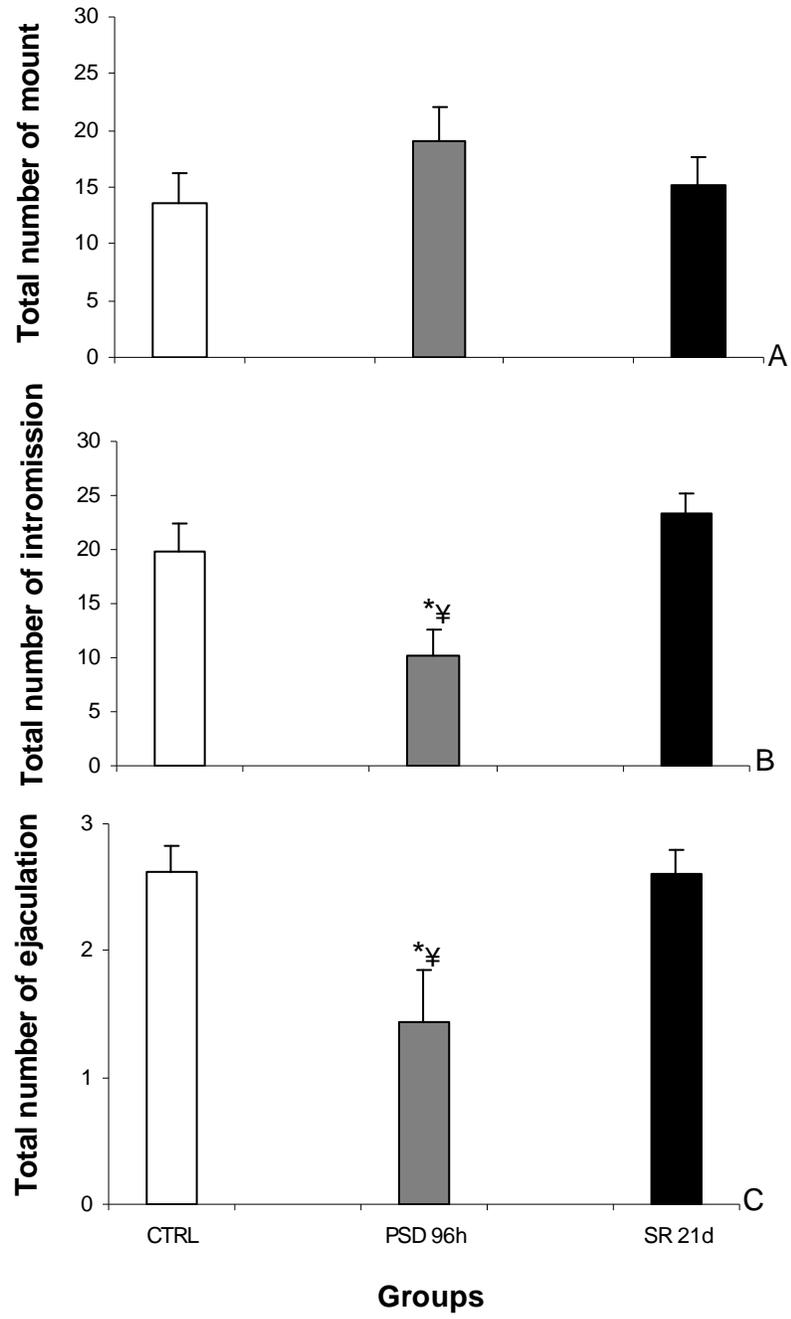


Figure 4

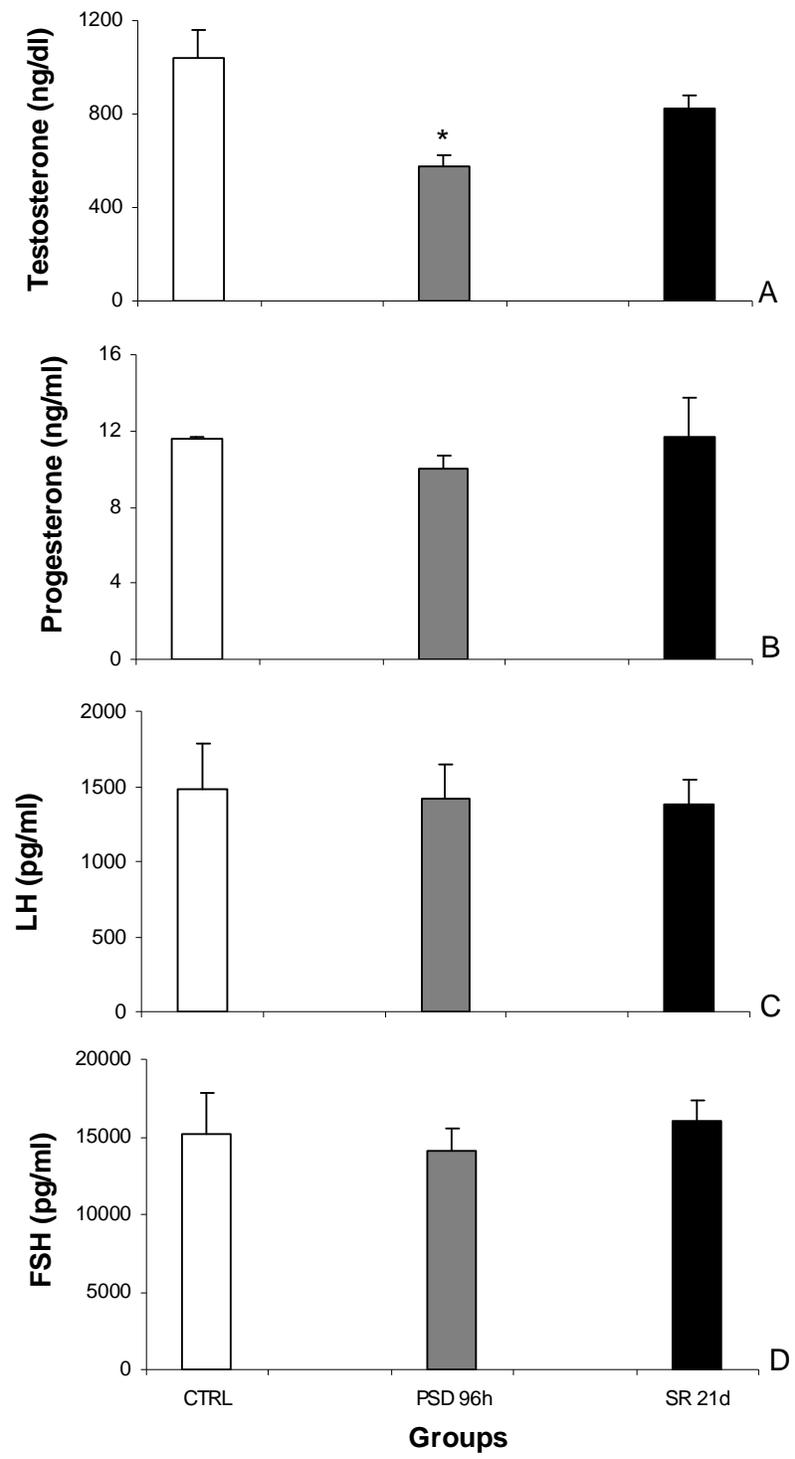


Figure 5

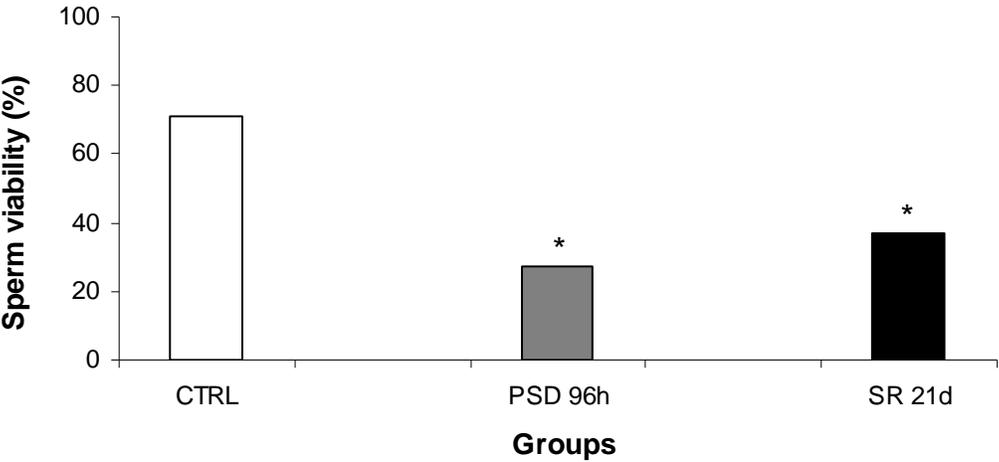


Table 1

Effect of paradoxical sleep deprivation (PSD 96h) or sleep restriction (SR 21d) on inter-copulatory interval, inter-intromission interval and copulatory rate.

	CTRL	PSD 96h	SR 21d
Inter-copulatory interval	29.2 ± 3.1	75.8 ± 26.8**	28.7 ± 4.6
Inter-intromission interval	40.6 ± 3.7	147.8 ± 48.8**	48.9 ± 8.3
Copulatory rate	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1**	0.6 ± 0.0

*Denotes a significant ($p < 0.01$) difference compared to a control (CTRL) group and **denotes a significant ($p < 0.01$) difference compared to the SR group.

Table 2

Effect of paradoxical sleep deprivation (PSD 96h) or sleep restriction (SR 21d) on sperm concentration, pH, volume and mobility parameters of sperm analysis according to type of movement: fast progressive (A), slow progressive (B), *in situ* (C) or quit (D).

	Concentration	Mobility parameters				pH	Volume (ml)
		A	B	C	D		
CTRL	110.5 ± 13.0	36.4 ± 5.7	12.4 ± 2.6	13.4 ± 3.1	36.0 ± 8.4	9.9 ± 0.5	0.4 ± 0.1
PSD 96h	93.9 ± 14.5	10.4 ± 2.6*	14.2 ± 3.8	13.8 ± 5.2	45.4 ± 6.8	8.8 ± 0.4	0.2 ± 0.0
SR 21d	99.6 ± 13.8	11.1 ± 4.5*	7.4 ± 2.3	10.3 ± 3.6	37.4 ± 10.2	9.7 ± 0.4	0.4 ± 0.1

* Denotes a significant ($p < 0.01$) difference compared to a control (CTRL) group.

6 Discussão

ARTIGO 1

Nossos resultados mostram que o treino para adquirir experiência sexual é um componente importante para um bom desempenho sexual em ratos machos. Após 9 dias de exposição à fêmeas receptivas, os ratos foram distribuídos em 2 grupos de acordo com a frequência ejaculatória: excelentes e adequados (Grupo 1) e baixo e nenhum (Grupo 2) desempenho sexual. O protocolo de treino estabelecido foi eficiente em reduzir a latência para a primeira ejaculação no Grupo 1, indicando a importância de submeter os animais a um tempo determinado de treino para que haja uma resposta sexual satisfatória. Enquanto que 42,5% dos ratos apresentaram desempenho sexual excelente durante todo o período de observação, 17,5% obtiveram um desempenho adequado, reforçando a hipótese que a experiência sexual melhora o desempenho sexual. No entanto, 32,5% dos animais não apresentaram qualquer resposta sexual. Interessantemente, os animais que apresentaram melhor desempenho sexual também tiveram níveis mais altos de progesterona. Por sua vez, os animais que apresentaram baixo/nenhum desempenho (Grupo 2) tiveram níveis significativamente reduzidos de testosterona em relação aos ratos do Grupo 1.

Adotamos a utilização deste protocolo de treino do CS, uma vez que ele permitiu a padronização da atividade copulatória, evitando assim, uma possível interferência sobre a análise dos dados. Por exemplo, seria tendencioso comparar um rato sexualmente inexperiente (*naïve*) que apresenta baixa atividade sexual durante a sessão de treino com outro rato experiente que pode ter resposta sexual adequada. Nota-se que alguns animais não apresentam nenhum CS até o 3^o e 4^o dia de treino, entretanto melhoram seu desempenho nos dias subsequentes (Tabela 1 - referente ao Artigo 1). O contrário também ocorreu: animais que apresentaram ótima resposta sexual até o 4^o dia, porém tiveram uma piora do desempenho nos dias posteriores, tornando-se ratos de baixo desempenho. Esses resultados corroboram estudos anteriores que demonstram que a experiência sexual pode

promover alterações na atividade sexual masculina. No entanto, não há um consenso na literatura sobre este tema. Em 2004, Portillo e Paredes demonstraram que 2 a 3% dos animais não apresentam qualquer comportamento copulatório. Ao analisar o CS, Ang e Ngai (2001) observaram que aproximadamente 100 ratos, de uma amostra ainda maior que foram incluídos no estudo, não demonstraram qualquer CS. Assim, parece haver uma grande variação na proporção de ratos que apresentam comportamento copulatório satisfatório.

Reconhecemos que 32,5% é uma proporção alta de animais com ausência de atividade sexual. Segundo Pottier e Baran (1973), os animais considerados não-copuladores podem sofrer de um quadro caracterizado por menor atividade e sensibilidade, com grau diferente de excitação sexual. Eles também relataram que aproximadamente 55% dos animais não-copuladores persistem nesta condição durante uma série de 7 experimentos. Em comparação aos animais experientes, os ratos *naïves* quando copulam, tendem a ter um aumento da latência para montas, intromissões e ejaculações. Poucos estudos têm comparado diretamente ratos copuladores e não-copuladores. Sabe-se que alguns animais *naïves* de outras espécies (hamster, gerbil, cobaia e carneiro) não copulam ou apresentam montas inconstantes durante os testes. A maioria desses animais nunca desenvolve comportamento copulatório mínimo necessário e muitas vezes são descartados (Harding e Feder, 1976; Pfau e Wilkins, 1995; Alexander et al., 1999; Sura et al., 2001).

Diversos estudos têm demonstrado uma discrepância nos resultados pode ser devido a vários fatores, como por exemplo, o período do protocolo de treinamento para o CS (Pfau e Wilkins, 1995; Sura et al., 2001; Wu e Gore, 2009). Desta forma, a diferença entre nosso estudo e outros achados da literatura pode ser atribuído à espécie (ratos x camundongos), linhagem (Wistar Hannover x Sprague-Dawley) ou o tempo de treino (tempo de exposição às fêmeas). Em nosso estudo, cada rato foi exposto a uma fêmea por um período de 9 dias, enquanto que no

estudo de Wu e Gore (2009), os ratos foram submetidos ao treino para adquirir experiência sexual 15 vezes (em dias alternados durante 30 dias). Esses achados sugerem que a experiência sexual pode ser modificada de acordo com a duração da estimulação sexual. Uma vez que 32,5% dos ratos avaliados não apresentaram qualquer atividade sexual durante as sessões de observação, pode-se afirmar que o protocolo de 9 dias, utilizado neste projeto, foi o tempo suficiente para escolher os animais que apresentam bom desempenho e identificar aqueles que não apresentam nenhum comportamento. Há especulação de que alguns ratos necessitam de períodos mais longos para se adaptarem ao ambiente de teste e exibirem alguma resposta sexual adequada frente às fêmeas receptivas (Kohlert e Bloch, 1996). No entanto, não podemos inferir isso no presente estudo, uma vez que os ratos utilizados não apresentaram qualquer CS (monta e intromissão) em todos os dias que foram avaliados.

A latência e a frequência para monta ou intromissão são parâmetros bem estabelecidos de CS. Entretanto, no presente estudo, foi considerado somente a frequência e a latência de ejaculação como representação do CS, uma vez que a ejaculação é o ponto final da cópula. Recentemente, foi relatado que existem alterações no comando espinhal de ratos para que ocorra a ejaculação (Borgdoff et al., 2009; Young et al., 2009; Staudt et al., 2011). Este estudo fornece evidência de que há uma diferença neurofisiológica entre os animais que apresentam um padrão de ejaculação rápido, normal ou lento, no qual pode ser representado pelo afastamento imediato da fêmea nos ratos que apresentam rápida ejaculação. Contudo, a sequência completa e integrada de vias hormonais e dos neurotransmissores necessários para a ejaculação ainda permanecem desconhecidos.

É bem documentado que a função sexual é modulada por hormônios esteróides. A testosterona tem sido apontada como o principal hormônio responsável pelo desempenho sexual masculino (motivação e atração) (para revisão ver Hull e

Dominguez, 2007; Sakuma, 2008; Andersen e Tufik, 2008; Wu e Gore, 2009). Em 2008, Nyby afirmou que as elevações de testosterona ocorrem normalmente durante o comportamento copulatório e que este hormônio pode ativar as respostas motivacionais e fisiológicas que facilitam a reprodução em ratos. Tem sido relatado que as concentrações de testosterona podem ser alterados por mera exposição à visão, odor, ou som de uma fêmea receptiva (Harding e Feder, 1976). As concentrações plasmáticas de testosterona aumentam significativamente em ratos quando expostos a uma fêmea receptiva (Bonilla-Jaime et al., 2006). A experiência sexual também aumenta as concentrações de testosterona no hipocampo de ratos quando comparados a ratos sexualmente imaturos (Edinger e Frye, 2007). No entanto, em ambos os estudos, os ratos foram submetidos a diferentes períodos de treino. No primeiro estudo (Bonilla-Jaime et al., 2006), os ratos foram submetidos a fêmeas receptivas por um curto período (1 dia). No segundo estudo (Edinger e Frye, 2007), os ratos foram expostos à experiência sexual durante toda a vida adulta (cerca de 1 ano). Em nosso estudo, a testosterona foi significativamente diminuída nos ratos de baixo desempenho (Grupo 2) em relação ao grupo de ótimo desempenho (Grupo 1), sugerindo que os níveis desse hormônio estão associados à resposta sexual. Além disso, os animais do Grupo 1 não apresentaram níveis aumentados de testosterona após 9 dias de treino quando comparados aos ratos que não foram submetidos ao treino (*naïves*). A diminuição da concentração de testosterona observada no Grupo 2 vai ao encontro aos estudos anteriores que indicam um papel importante da testosterona no CS de ratos, apoiando assim a ação dos andrógenos na resposta sexual masculina. Em um experimento semelhante ao nosso, as concentrações de testosterona não diferiram entre ratos de baixa ou adequada atividade sexual (Harding e Feder, 1976). Por outro lado, Wu e Gore (2009) observaram que ratos experientes apresentaram as concentrações de testosterona mais altas do que ratos machos *naïves*. Em contraste, Portillo e colaboradores (2006) mostraram que ratos com baixa atividade sexual não apresentaram diminuição das concentrações de testosterona em comparação aos

ratos de bom desempenho sexual. Tomados em conjunto, a complexa resposta hormonal associada à atividade copulatória não está totalmente elucidada, e por esse motivo, justifica-se ainda mais experimentos para esclarecer as influências que a experiência sexual pode exercer sobre as concentrações de testosterona, bem como a ação de outros hormônios que possam estar relacionados a esse fenômeno.

Recentemente, Portillo e colaboradores (2007) confirmaram a hipótese de que a concentração da atividade da aromatase no cérebro é menor em não-copuladores do que em ratos com alto índice copulatório. A testosterona pode ser metabolizada no cérebro por meio da aromatização em estradiol. Deste modo, podemos inferir que os ratos do Grupo 2 que tiveram uma redução nos níveis de testosterona poderiam apresentar menores níveis de estradiol. Neste sentido, o estradiol obtido através da aromatização de testosterona no cérebro também apresenta um papel importante no CS masculino (Portillo et al., 2007). Assim, essas descobertas lançam uma possível explicação para a compreensão do perfil hormonal relacionado ao baixo desempenho sexual em ratos.

A progesterona é um hormônio esteróide que regula grande parte dos processos envolvidos no desenvolvimento e na manutenção da função reprodutiva (Clark e Peck, 1979; Oettel e Mukhopadhyay, 2004; Andersen et al., 2006a). É bem documentada que a progesterona exerce um papel central na reprodução feminina, e uma grande quantidade de pesquisas tem se concentrado na elucidação dos mecanismos neurais e endócrinos da progesterona em fêmeas. Entretanto, pouca atenção, tem sido dirigida para o seu possível papel na função do CS masculino. Em seres humanos, um estudo inicial feito por Heller e colaboradores (1958) mostrou uma diminuição na libido sexual em 4 homens que receberam tratamento com progesterona. Na década de 1970, o tratamento de progesterona foi usado para reduzir o desejo sexual exacerbado (Money, 1970) e no tratamento de alguns CS anormais (Cooper, 1986). Em contraste a esses estudos, foi relatado que a suplementação de progesterona em ratos machos castrados poderia promover

diversos eventos sexuais, mesmo na ausência de outros esteróides relacionados a esse comportamento (Witt et al., 1995).

Ao longo dos últimos anos, nosso grupo tem consistentemente estudado a influência da progesterona nos reflexos genitais de ratos machos expostos a PSP. Por exemplo, a administração de progesterona após a privação de sono em ratos castrados (Andersen et al., 2004b) e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Andersen et al., 2007) induziu aumento pronunciado de ereções em relação aos ratos administrados com testosterona. Ainda, o pré-tratamento com mifepristona, (antagonista do receptor de progesterona) reduziu significativamente o percentual de ratos que apresentaram ereções (Andersen et al., 2005). Nota-se que esses estudos indicam a ação direta da progesterona nos eventos de ereção peniana. Enquanto Andersen e colaboradores descreveram a influência da progesterona nos reflexos genitais, no presente estudo, os resultados indicam que a progesterona também desempenha um papel no comportamento copulatório em ratos machos. Portanto, especula-se que a progesterona pode ser um fator hormonal relevante para promover uma boa resposta sexual masculina. Em relação ao comportamento de cópula, também encontramos que a progesterona está envolvida nos mecanismos de ejaculação em ratos privados de sono, uma vez que os ratos que apresentaram frequência de ejaculação normal apresentaram maiores concentrações de progesterona (Alvarenga et al., 2009).

Interessantemente, observou-se no presente estudo que o grupo de animais com melhor atividade sexual (Grupo 1) também apresentou um aumento nas concentrações de progesterona em comparação com os ratos *naïves* e com os ratos do Grupo 2 (baixo/nenhum desempenho sexual). De fato, a progesterona também esteve 3,8 vezes maior no Grupo 1 em relação aos animais controles *naïves*. Esses resultados sugerem que a resposta sexual excelente do Grupo 1 pode estar relacionada com o aumento na liberação de progesterona. Desta forma, nossos dados fornecem mais evidências da participação desse hormônio no CS

masculino. Além disso, esses achados sugerem que o bom desempenho sexual é acompanhado por altas concentrações de progesterona, que por sua vez, pode ser considerada um fator limitante para a promoção do desempenho sexual em ratos machos. Nesse sentido, especula-se que uma concentração ideal de progesterona deva ser necessária para que os animais apresentem atividade copulatória satisfatória.

Em resumo, este estudo teve por objetivo investigar como o treino para adquirir experiência sexual poderia influenciar o desempenho sexual, e se hormônios como a testosterona e a progesterona poderiam modular este comportamento. Em relação ao treino, nosso estudo demonstra que para o rato macho ter um bom desempenho é necessário um tempo mínimo de exposição à fêmeas receptivas, e que alguns ratos ainda não conseguem alcançar o desempenho adequado mesmo após 9 dias. Desta forma, podemos observar a evolução do CS dia-a-dia, como representado na Figura 2C. De fato, esta figura mostra que a partir do 4^o dia de treinamento, os animais com excelente desempenho apresentaram uma redução na latência para ejaculação. Tomados em conjunto, nossos dados demonstram que a investigação do CS em ratos requer não só uma exposição prévia a fêmeas receptivas, mas também um tempo mínimo de treino. Além disso, observamos que a testosterona, considerada um fator importante para a função sexual masculina estava reduzida nos ratos que tinham baixa/nenhuma atividade sexual, enquanto que a progesterona estava significativamente elevada nos animais com melhor desempenho sexual. Nossos resultados sugerem que a progesterona pode ter consequências funcionalmente relevantes para a resposta sexual masculina e que esse hormônio desempenha um papel mais importante no controle do CS masculino do que tem sido comumente documentado.

ARTIGO 2

A diminuição do tempo de sono presente na sociedade atual pode levar ao comprometimento de diversas funções do nosso organismo, em especial o funcionamento adequado do sistema endócrino que pode acarretar em prejuízos no CS e conseqüentemente na função reprodutiva. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar as conseqüências da falta de sono nos parâmetros reprodutivos. Nossos resultados indicam que a PSP por 96 horas foi capaz de diminuir significativamente o desempenho sexual em ratos sexualmente ativos. Por sua vez, os animais submetidos a RS crônica por 21 dias não apresentaram nenhuma diferença significativa no padrão de CS quando comparado aos animais CTRL. Quanto às alterações hormonais, os ratos submetidos à PSP tiveram uma diminuição das concentrações de testosterona quando comparado ao grupo CTRL. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos nas concentrações de progesterona. Em relação à análise do sêmen, ambos os grupos PSP e RS apresentaram uma menor viabilidade espermática em relação ao grupo CTRL (50% e 15%, respectivamente). Porém, a diminuição dos espermatozoides vivos foi mais acentuada no grupo PSP.

Manipulações dessas variáveis foram concebidas e executadas na tentativa de ampliar a compreensão das interações complexas subjacentes à regulação do CS em mamíferos. Nos últimos anos, nosso grupo tem demonstrado os efeitos da PSP na função erétil. De fato, a PSP apresenta um efeito facilitatório sobre os reflexos genitais em ratos jovens (Andersen et al., 2003), adultos (Andersen et al., 2005, 2006a, 2007; Andersen e Tufik, 2006; Alvarenga et al., 2006) como idosos (Andersen et al., 2002, 2004a). Em particular, a PSP apresenta efeitos heterogêneos, porém significativos no repertório completo do CS. Nossos dados demonstram que a motivação e o desempenho sexual, refletidos por latências de monta e intromissão, foram reduzidos nos grupos privados de sono quando comparados aos respectivos grupos CTRL (Alvarenga et al., 2009).

No presente estudo, a influência da falta de sono após um período de 96 horas de PSP prejudicou o CS de ratos machos que previamente apresentavam excelente resposta sexual. A piora do desempenho sexual se deu pelo aumento da latência para iniciar o comportamento de intromissão e redução do número total de intromissões e ejaculações. Esses resultados corroboram nossos achados prévios (Alvarenga et al., 2009). No entanto, quando o período de diminuição do tempo de sono foi expandido na tentativa de mimetizar a situação de débito crônico de sono, o grupo submetido a RS não apresentou nenhuma alteração significativa tanto na motivação quanto no desempenho sexual. Essa resposta do grupo RS pode ter sido influenciada pela ação dos hormônios sexuais, já que esses animais não tiveram uma redução das concentrações de testosterona após 21 dias de RS e ainda, mantiveram concentrações de progesterona semelhante aos dos grupos CTRL e PSP.

De fato, os efeitos da experiência sexual podem modular o desempenho sexual e o perfil hormonal de ratos machos (Alvarenga et al., 2010). Foi observado que a experiência sexual melhora o desempenho e ainda permite a distinção de animais com excelente e baixo/nenhum desempenho sexual. No nosso estudo anterior, demonstramos que ratos submetidos ao treino para adquirir experiência sexual e que apresentaram ótimo desempenho tiveram aumento das concentrações de progesterona, sugerindo que a progesterona se mostra necessária para uma resposta sexual satisfatória em machos. Por outro lado, no presente estudo não foi observado alterações marcantes nas concentrações de progesterona. Especula-se que os animais já apresentavam altas concentrações de progesterona (causado pelo treino de CS - Alvarenga et al., 2010) antes de serem submetidos aos protocolos de PSP/RS e assim, um possível “efeito teto” pode ter acontecido, uma vez que a PSP também aumenta significativamente a concentração deste hormônio (Andersen et al., 2004b, 2005). Além disso, como a progesterona participa da biossíntese da testosterona nas células de Leydig (ver revisão de Oettel e

Mukhopadhyay, 2004) e a PSP promoveu redução dos níveis de testosterona, a via de metabolização da progesterona em androstenediona e conseqüentemente em testosterona pode estar com funcionamento anormal, fazendo com que haja essa diminuição de testosterona tão robusta no grupo PSP. Neste sentido, parece existir um balanço ideal entre testosterona e progesterona para que aconteça uma resposta adequada no CS masculino.

Até o presente momento, nenhum estudo investigou os efeitos da privação de sono no processo de formação dos espermatozoides. Nossos achados indicam que a diminuição do tempo de sono promoveu um comprometimento na função reprodutiva, representado pela diminuição da viabilidade espermática. Os animais que foram submetidos à PSP apresentaram uma redução de 50% de espermatozoides vivos em relação ao grupo CTRL. O grupo RS também apresentou uma viabilidade espermática 15% menor do que os animais do grupo CTRL. A princípio nossa hipótese era que a testosterona, por estar diminuída após a PSP (Andersen et al., 2003, 2005; Alvarenga et al., 2009) e ser um dos principais responsáveis pela manutenção do ciclo espermático (Sofikitis et al., 2008; Walker, 2009) poderia ser o fator principal desse prejuízo. No entanto, como os animais do grupo RS não apresentaram diminuição desse hormônio, não é possível inferir que a alteração da viabilidade espermática tenha sido decorrente do declínio na concentração de testosterona.

Hormônios como o LH e FSH também podem ser influenciados pela falta de sono ou condições estressantes. Em humanos, Nindl e colaboradores (2006) relataram que após um período de estresse, entre eles RS (treinamento militar), houve um aumento da concentração de LH, enquanto que o FSH manteve-se inalterado após uma privação parcial de sono (Baumgartner et al., 1993). Sabe-se que hormônios gonadotrópicos como o FSH são responsáveis pelo início do processo da espermatogênese, enquanto que o LH é o estímulo primordial para a secreção da testosterona que, por sua vez também atua neste processo.

Considerando que a testosterona potencializa a ação de FSH (Mclachlan et al., 1995; Singh e Handelsman, 1996; Sousa et al., 2002), e na condição de PSP a testosterona está significativamente diminuída, podemos sugerir que a ação do FSH também poderia estar reduzida, e por conta disso haveria um comprometimento da viabilidade espermática. Entretanto, nossos resultados demonstram que tanto o FSH quanto o LH não estão significativamente alterados após a PSP e RS, sugerindo que os prejuízos na viabilidade espermática não são diretamente decorrentes da variação desses hormônios.

Considerando que o ciclo espermático do rato dura em torno de 56 dias, pode-se afirmar que o espermatozóide já estava formado nesses animais antes de serem submetidos aos protocolos de PSP e RS. Desta forma, os danos ocorridos podem ser resultantes do ambiente no qual o espermatozóide foi armazenado ou passou antes de ser expelido na ejaculação. Provavelmente uma alteração morfológica nessas estruturas (próstata, epidídimo e testículo) poderia comprometer o espermatozóide após sua formação. Outra questão que pode ser levantada é em relação à temperatura corpórea dos animais. Para conservação dos espermatozóides é necessária uma temperatura ideal, uma vez que eles são extremamente vulneráveis a variações de temperatura. Sabe-se que animais submetidos à PSP perdem a capacidade de manter o controle da temperatura corporal, apresentando hipertermia (Seabra e Tufik, 1993; Hoshino, 1996; Palma et al., 2009).

Neste sentido, podemos sugerir que uma alteração na função fisiológica, como a temperatura, possa ser responsável pelo dano na viabilidade espermática. No entanto, até este momento não há estudos sobre os efeitos da PSP especificamente sobre esses parâmetros relacionados à fertilidade masculina.

Em resumo, o CS é dependente da ação combinada de vários fatores que integram uma complexa cascata de eventos que envolvem hormônios e

contextos ambientais. O presente estudo demonstra que a falta de sono resulta em prejuízo tanto do CS como comprometimento reprodutivo, refletido pela diminuição da viabilidade espermática. Esses achados alertam que além das consequências já conhecidas da privação de sono, o débito de sono observado atualmente pode prejudicar a fertilidade masculina, e em decorrência disso, comprometer a perpetuação da espécie.

7 Sumário e Conclusões

1. O treino para adquirir experiência sexual de 9 dias não foi suficiente para que alguns animais apresentassem um bom desempenho sexual, indicando a importância do treino para atividade sexual satisfatória. Além disso, sugerimos que não só a testosterona, mas também a progesterona possui um papel fundamental para um bom desempenho sexual.
2. A privação de sono paradoxal prejudicou o desempenho sexual, embora as concentrações de progesterona não tenham sido alteradas, houve uma diminuição das concentrações de testosterona. Ainda, foi observada uma redução em 50% da viabilidade espermática desses animais. Em relação aos animais que foram expostos à restrição de sono, podemos concluir que este protocolo foi menos prejudicial, uma vez que o padrão do comportamento sexual e as concentrações hormonais não sofreram alterações marcantes. Contudo, a restrição de sono reduziu em 15% a viabilidade espermática.
3. As concentrações dos hormônios folículo-estimulante e luteinizante não estão envolvidas nas alterações reprodutivas induzidas pela falta de sono, em especial na viabilidade espermática.

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais deste projeto, conclui-se que a progesterona é um fator importante para desempenho sexual, apesar de haver um balanço ideal entre testosterona e progesterona para que isso ocorra devidamente. Além disso, a diminuição no tempo de sono, independentemente das concentrações hormonais envolvidas no processo da espermatogênese, leva a prejuízos na função reprodutiva podendo comprometer a perpetuação da espécie.

8 Referências Bibliográficas

- Allard JS, Tizabi Y, Shaffery JP, Manaye K. Effects of rapid eye movement sleep deprivation on hypocretin neurons in the hypothalamus of a rat model of depression. *Neuropeptides* 2007; 41:329-37
- Alexander BM, Stellflug JN, Rose JD, Fitzgerald JA, Moss GE. Behavior and endocrine correlates related to exposure of heterosexual, low-performing and male-oriented domestic rams to rams and ewes in estrus. *J Anim Sci* 1999;77:1864-1869.
- Alvarenga TA, Andersen ML, Papale LA, Tufik S. Effects of long-term food restriction on genital reflexes in paradoxically sleep-deprived male rats. *Brain Res* 2006; 1115:148-154
- Alvarenga TA, Patti CL, Andersen ML, Silva RH, Calzavara MB, Lopez GB, Frussa-Filho R, Tufik, S. Paradoxical sleep deprivation impairs acquisition, consolidation, and retrieval of a discriminative avoidance task in rats *Neurobiol Learn Mem* 2008; 90:624-632
- Alvarenga TA, Andersen ML, Velazquez-Moctezuma J, Tufik S. Food restriction or sleep deprivation: which exerts a greater influence on the sexual behaviour of male rats? *Behav Brain Res*, 2009;202:266-271.
- Alvarenga TA, Andersen ML, Tufik S. Influence of progesterone on sexual performance in male rats. *J Sex Med*, 2010;7:2435-444.
- Andersen ML, Palma BD, Rueda AD, Tufik S. The effects of acute cocaine administration in paradoxical sleep-deprived rats. *Addict Biol* 2000; 5(4):417-420
- Andersen ML, Tufik S. Distinct effects of paradoxical sleep deprivation and cocaine administration on sexual behaviour in male rats. *Addict Biol*, 2002;7:251-253.
- Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Does sleep deprivation and cocaine induce penile erection and ejaculation in old rats? *Addict Biol* 2002; 7:285-290
- Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Influence of paradoxical sleep deprivation and cocaine on development of spontaneous penile reflexes in rats of different ages. *Brain Res* 2003; 968:130-138

- Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Hormone treatment facilitates penile erection in castrated rats after sleep deprivation and cocaine. *J Neuroendocrinol* 2004a; 16:154-159
- Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Effects of chronic stress on steroid hormones secretion in male rats. *Braz J Med Biol Res* 2004b; 37:791-797
- Andersen ML, Tufik S. Effects of progesterone blockade over cocaine-induced genital reflexes of paradoxical sleep deprived male rats. *Horm Behav* 2005; 47: 477-484
- Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res* 2005; 14:83-90
- Andersen ML, Antunes IB, Tufik S. Effects of paradoxical sleep deprivation on genital reflexes in five rat strains. *Horm Behav* 2006a; 49:173-80
- Andersen ML, Bittencourt LR, Antunes IB, Tufik S. Effects of progesterone on sleep: a possible pharmacological treatment for sleep-breathing disorders? *Curr Med Chem* 2006b;13:3575-3582
- Andersen ML, Tufik S. Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res Rev* 2006; 51:136-143
- Andersen ML, Martins RC, Alvarenga TA, Antunes IB, Papale LA, Tufik S. Progesterone reduces erectile dysfunction in sleep-deprived spontaneously hypertensive rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5:7
- Andersen ML, Tufik S. The effects of testosterone on sleep and sleep-disordered breathing in men: its bidirectional interaction with erectile function. *Sleep Med Rev* 2008; 12:365-379
- Andersen ML, Santos-Silva R, Bittencourt LR, Tufik S. Prevalence of erectile dysfunction complaints associated with sleep disturbances in Sao Paulo, Brazil: a population-based survey. *Sleep Med* 2010;11:1019-1024

- Andersen ML, Alvarenga TA, Mazaro-Costa R, Tufik S. The association of testosterone, sleep, and sexual function in men and women. *submetido*
- Ang HH, Ngai TH. Aphrodisiac evaluation in non-copulator male rats after chronic administration of *Eurycoma longifolia* Jack. *Fundam Clin Pharmacol.* 2001;15:265-268
- Antunes IB, Andersen ML, Baracat EC, Tufik S. The effects of paradoxical sleep deprivation on estrous cycles of the female rats. *Horm Behav* 2006; 49:433-440
- Baumgartner A, Dietzel M, Saletu B, Wolf R, Campos-Barros A, Gräf KJ, Kürten I, Mannsmann U. Influence of partial sleep deprivation on the secretion of thyrotropin, thyroid hormones, growth hormone, prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and estradiol in healthy young women. *Psychiatry Res*, 1993;48:153-178
- Benedetti F, Dallaspezia S, Fulgosi MC, Barbini B, Colombo C, Smeraldi E. Phase advance is an actimetric correlate of antidepressant response to sleep deprivation and light therapy in bipolar depression. *Chronobiol Int* 2007; 24:921-37
- Benedetti F, Fresi F, Maccioni P, Smeraldi E. Behavioural sensitization to repeated sleep deprivation in a mice model of mania. *Behav Brain Res* 2008; 187:221-227
- Beyer C, Morali G, Naftolin F, Larsson K, Perez-Palacios G. Effect of some antiestrogens and aromatase inhibitors on androgen induced sexual behaviour in castrated male rats. *Horm Behav* 1976; 7:353-363
- Bialy M, Rydz M, Kaczmarek L. Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behav Neurosci.* 2000; 114:983-990
- Boethel CD. Sleep and the endocrine system: new associations to old diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2002;8:502-505
- Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Arteaga-Silva M, Retana-Márquez S. Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats. *Horm Behav* 2006; 49:376-382

- Bonnet MH, Arand DL. We are chronically sleep deprived. *Sleep* 1995; 18:908-911
- Borgdorff AJ, Rössler AS, Clément P, Bernabé J, Alexandre L, Giuliano F. Differences in the spinal command of ejaculation in rapid ejaculating rats. *J Sex Med* 2009; 6:2197-205
- Canchola E, Monroy E, Velazquez-Moctezuma J. REM sleep deprivation facilitates the estrogen effect on heterotypical sexual behavior in male rats. *Physiol Behav* 1986; 37:33-37
- Chu X, Zhavbert ES, Dugina JL, Kheyfets IA, Sergeeva SA, Epstein OI, Agmo A. Sildenafil and a compound stimulating endothelial NO synthase modify sexual incentive motivation and copulatory behavior in male Wistar and Fisher 344 rats. *J Sex Med.* 2008;9:2085-99
- Clark JH, Peck EJ Jr. Female sex steroids: receptors and function. *Monogr Endocrinol* 1979;14:1-245
- Cooper AJ. Progestogens in the treatment of male sex offenders: a review, *Can. J. Psychol* 1986; 31:73-79
- Cross E, Roselli CE. 17beta-estradiol rapidly facilitates chemoinvestigation and mounting in castrated male rats. *Am J Physiol* 1999; 276(5 Pt 2):R1346-50
- Dahlöf LG, Larsson K. Copulatory performances of penile desensitized male rats as a function of prior social and sexual experience. *Behav Biol* 1978; 24:492-497
- D'Almeida V, Hipólido DC, Azzalis LA, Lobo LL, Junqueira VB, Tufik S. Absence of oxidative stress following paradoxical sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett* 1997; 235:25-28
- Dement W. The effect of dream deprivation. *Science* 1960; 131:1705-1707
- Edinger KL, Frye CA. Sexual experience of male rats influences anxiety-like behavior and androgen levels. *Physiol Behav* 2007; 92:443-453

- Ferguson, J. e Dement, W. The behavioral effects of amphetamine on REM deprived rats. *J Psychiatr Res* 1969; 7:111-119
- Ferrini-Strambi L, Oldani A, Zucconi M, Castronovo V, Montorsi F, Rigatti P, Smirne S. Sleep-related painful erections: clinical and polysomnographic features. *J Sleep Res* 1996; 5:195-197
- Frankel AI. Hormone release during computer-monitored sexual behavior in mature and aged male rats. *Horm Behav* 1981; 15:312-20
- Frussa-Filho R, Gonçalves MT, Andersen ML, de Araújo NP, Chinen CC, Tufik S. Paradoxical sleep deprivation potentiates amphetamine-induced behavioural sensitization by increasing its conditioned component. *Brain Res* 2004; 1003:188-193
- Fukushiro DF, Calzavara MB, Trombin TF, Lopez GB, Abílio VC, Andersen ML, Tufik S, Frussa-Filho R. Effects of environmental enrichment and paradoxical sleep deprivation on open-field behavior of amphetamine-treated mice. *Physiol Behav* 2007; 92:773-9
- Gerardin DC, Pereira OC, Kempinas WG, Florio JC, Moreira EG, Bernardi MM. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiol Behav* 2005; 84:97-104
- Giedke H, Schwärzler F. Therapeutic use of sleep deprivation in depression. *Sleep Med Rev* 2002; 6:361-77
- Gomes CM, Donadio MV, Anselmo-Franci J, Franci CR, Lucion AB, Sanvitto GL. Neonatal handling induces alteration in progesterone secretion after sexual behavior but not in angiotensin II receptor density in the medial amygdala: implications for reproductive success. *Life Sci* 2006; 78:2867-71
- Harding CF, Feder HH. Relation between individual differences in sexual behavior and plasma testosterone levels in the guinea pig. *Endocrinology* 1976; 98:1198-1205

- Heller CG, Laidlaw WM, Harvey HT Nelson WO, Effects of progestational compounds on the reproductive processes of the human male, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 71;1958, pp. 165-172
- Hermo, L. e Clermont, Y. How are germ cells produced and what factors control their production? In: Robaire, B.; Pryor, J.L. & Trasler, J.M. (eds.) *Handbook of andrology*. São Francisco: American Society of Andrology 1995
- Hicks RA, Bautista J, Phillips N. REM sleep deprivation does not increase the sexual behaviors of male rat. *Perceptual Motor Skills* 1991;73:127-130
- Hoshino K. Food deprivation and hypothermia in desynchronized sleep-deprived rats. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29:41-46
- Howland RH. Sleep interventions for the treatment of depression. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*, 2011;49:17-20
- Hull EM, Dominguez JM. Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav* 2007; 52:45-55
- Kalil B. A progesterona como marcador de estresse: diferenças intersexuais. Orientador: Janete Aparecida Anselmo-Franci. Ribeirão Preto: FMRP/USP, 2010, 80p. Dissertação. (Mestrado em Ciências).
- Kohlert JG, Bloch GJ. Hyperactivity in hyposexual male rats. *Physiol Behav* 1996; 59:171-78
- Krey LC, McGinnis MY. Time-courses of the appearance/disappearance of nuclear androgen + receptor complexes in the brain and adenohipophysis following testosterone administration/withdrawal to castrated male rats: relationships with gonadotropin secretion. *J Steroid Biochem* 1990; 35:403-8
- Kripke DF. Circadian rhythm phases in affective illnesses. *Chronobiologia* 1979; 6:365-375
- Larsson K. Conditioning and sexual behavior in the male albino rat. *Acta Psychol Gothob* 1956; 1:261-269

- Lo KC, Lei Z, Rao ChV, Beck J, Lamb DJ. De novo testosterone production in luteinizing hormone receptor knockout mice after transplantation of leydig stem cells. *Endocrinology* 2004;145:4011-4015
- Lucio RA, Tlachi-López JL. Análisis de la Cópula y el eyaculado en la rata albina. 1ª edição, Tlaxcala, México, 2008
- Machado RB, Hipólido DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. Sleep deprivation induced by multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res* 2004; 1004:45-51
- Machado RB, Suchecki D, Tufik S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. *Behav Brain Res* 2005; 160:356-364
- Manzo J, Garcia LI and Coria-Avila G. Control autonómico de la conducta sexual masculina. Em: Manzo J (Ed.) *Neuroetología: La década del cerebro y la conducta animal*. Universidad Veracruzana (Ed.) Xalapa, Mexico; pp73-87, 2002
- Martins FG e Abdo CH. Erectile dysfunction and correlated factors in Brazilian men aged 18-40 years. *J. Sex. Med* 2010; 6:2166-2173
- Martins PJ, Marques MS, Tufik S, D'Almeida V. Orexin activation precedes increased NPY expression, hyperphagia, and metabolic changes in response to sleep deprivation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298:E726-734
- McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM, de Kretser DM. Hormonal control of spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 1995; 6:95-101
- Meisel RL, Sachs BD. The physiology of male sexual behavior. In: E. Knobil and J.D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd Edn., Vol. 2, Raven Press, New York, 1994, pp. 3-105
- Money J. Use of an androgen-depleting hormone in the treatment of male sex offenders, *J. Sex Res* 1970;6:165-172.
- National Sleep Foundation. 2002. *Sleep in America Poll*. Washington DC.

- Neubert, D.; Chahoud, I. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. *Endocrin Chem Environ* 1995; 3:24-52
- Nindl BC, Rarick KR, Castellani JW, Tuckow AP, Patton JF, Young AJ, Montain SJ. Altered secretion of growth hormone and luteinizing hormone after 84 h of sustained physical exertion superimposed on caloric and sleep restriction. *J Appl Physiol* 2006; 100:120-128
- Nyby JG. Reflexive testosterone release: a model system for studying the nongenomic effects of testosterone upon male behavior. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29:199-210
- Oettel M, Mukhopadhyay AK. Progesterone: the forgotten hormone in men? *Aging Male* 2004; 7:236-257
- Palma BD, Nobrega JN, Gomes VL, Esumi LA, Seabra ML, Tufik S, Hipolide DC. Prostaglandin involvement in hyperthermia induced by sleep deprivation: a pharmacological and autoradiographic study. *Life Sci* 2009; 84:278-281
- Pereira OC, Bernardi MM, Gerardin DC. Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? *Life Sci* 2006; 78:2767-71
- Perry JC, Bergamaschi CT, Campos RR, Andersen ML, Montano N, Casarini DE, Tufik S. Sympathetic and angiotensinergic responses mediated by paradoxical sleep loss in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2011; *in press*.
- Perry JC, D'Almeida V, Antunes IB, Tufik S. Distinct behavioral and neurochemical alterations induced by intermittent hypoxia or paradoxical sleep deprivation in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32:87-94
- Pfaus JG, Wilkins MF. A novel environment disrupts copulation in sexually naïve but not experienced male rats: reversal with naloxone. *Physiol Behav*. 1995; 57:1045-9

- Phelps SM, Lydon JP, O'Malley BW, Crews D. Regulation of male sexual behaviour by progesterone receptor, sexual experience and androgen. *Horm Behav* 1998;34:294-302
- Portillo W, Castillo CG, Retana-Márquez S, Roselli CE, Paredes RG. Neuronal activity of aromatase enzyme in non-copulating male rats. *J Neuroendocrinol.* 2007;19:139-41
- Portillo W, Díaz NF, Retana-Márquez S, Paredes RG. Olfactory, partner preference and Fos expression in the vomeronasal projection pathway of sexually sluggish male rats. *Physiol Behav* 2006; 88:389-97
- Portillo W, Paredes RG. Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Horm Behav* 2004; 46:330-40.
- Pottier JJ, Baran D. A general behavioral syndrome associated with persistent failure to mate in the male laboratory rat. *J Comp Physiol Psychol* 1973; 83:499-509
- Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J. Changes in masculine sexual behavior corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm Behav* 2003; 44:327-37
- Roselli CE, Chambers K. Sex differences in male-typical copulatory behaviors in response to androgen and estrogen treatment in rats. *Neuroendocrinology.* 1999; 69:290-298
- Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 2010; 205:117-31
- Sakuma Y. Neural substrates for sexual preference and motivation in the female and male rat. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1129:55-60
- Seabra Mde L, Tufik S. Sodium diclofenac inhibits hyperthermia induced by paradoxical sleep deprivation: the possible participation of prostaglandins. *Physiol Behav,* 1993; 54:923-926

- Singh J, Handelsman DJ. The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. *J Androl* 1996; 17:382-393
- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 109:323-330
- Soukhova-O'Hare GK, Schmidt MH, Nozdrachev AD, Gozal D. A novel mouse model for assessment of male sexual function. *Physiol Behav* 2007; 91:535-543
- Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Ferraz L, Teixeira da Silva J, et al. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum Reprod* 2002; 17:1800-1810
- Staudt MD, de Oliveira CV, Lehman MN, McKenna KE, Coolen LM. Activation of NMDA Receptors in Lumbar Spinothalamic Cells is Required for Ejaculation. *J Sex Med* 2011 *in press*
- Suchecki D, Tiba PA, Tufik S. Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. *J Neuroendocrinol* 2002; 14:549-54
- Sura A, Overstreet DH, Marson L. Selectively bred male rat lines differ in naïve and experienced sexual behavior. *Physiol Behav* 2001; 72:13-20
- Tasali E, Leproult R, Ehrmann DA, Van Cauter E. Slow-wave sleep and the risk of type 2 diabetes in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:1044-9
- Tufik S, Andersen ML, Bittencourt LR, Mello MT. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *An Acad Bras Cienc* 2009; 81:521-38
- Tufik S, Lindsey CJ, Carlini EA. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology* 1978; 16:95-108

- Van Cauter E, Blackman JD, Roland D, Spire JP, Refetoff S, Polonsky KS. Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *J Clin Invest* 1991; 88:934-42
- Van Cauter E, Spiegel K. Sleep as a mediator of the relationship between socioeconomic status and health: a hypothesis. *Ann NY Acad Sci* 1999; 896:254-261
- Van Cauter E, Spiegel K, Tasali E, Leproult R. Metabolic consequences of sleep and sleep loss. *Sleep Med* 2008; 9:S23-28
- Velazquez-Moctezuma J, Monroy E, Beyer C, Canchola E. Effects of REM deprivation on the lordosis response induced by gonadal steroids in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 1984; 32:91-4
- Velázquez-Moctezuma J, Salazar ED, Renata-Márquez S. Effects of Short- and long-term REM sleep deprivation on sexual behavior in male rats. *Physiol. Behav* 1996; 59:277-281
- Verma S, Chhina GS, Kumar VM, Singh B. Effect of rapid eye movement sleep deprivation on sexual behaviour of male rats. *Indian J Exp Biol* 1989; 27:892-894
- Vimont-Vicary P, Jouvet-Mounier D, Delorme F. EEG and behavioral effects of deprivation of paradoxical sleep in cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1966; 20:439-49
- Walker WH. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* 2009; 74:602-607
- Whitley, R. J.; Meikle, A. W.; Watts N. B. Endocrinology. In: Ashwood, E. R.; Burtis C. A. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. p.1645-1660
- Witt DM, Young LJ, Crews D. Progesterone and sexual behavior in males. *Psychoneuroendocrinol* 1994;19:553-562

- Witt DM, Young LJ, Crews D. Progesterone modulation of androgen-dependent sexual behavior in male rats. *Physiol Behav* 1995; 57:307-13
- Wu D, Gore AC. Sexual experience changes sex hormones but not hypothalamic steroid hormone receptor expression in young and middle-aged male rats. *Horm Behav* 2009; 56:299-308
- Young B, Coolen L, McKenna K. Neural regulation of ejaculation. *J Sex Med* 2009; 6:229-233.
- Zager A, Andersen ML, Ruiz FS, Antunes IB, Tufik S. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293:504-509
- Zarcone V, Zukowsky E, Gulevich G, Dement W, Hoddes E. Rorschach responses subsequent to REM deprivation in schizophrenic and nonschizophrenic patients. *J Clin Psychol* 1974 ;30:248-250

9 Anexos

Anexo 1. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/EPM.

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO	Data: 18-04-2011 19:12:49 Pagina 1/2 id = 707
São Paulo, 27 de Março de 2009 CEP 0071/09		
Ilmo(s). Sr(a). Pesquisador(a) Monica Levy Andersen Co-Investigadores: Tathiana Alvarenga; Sergio Tufik; Disciplina/Departamento Medicina e Biologia do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo Patrocinador Associação Fundo de Incentivo a Psicofarmacologia		
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL		
Ref: Projeto de pesquisa intitulado: 'EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO NA FUNÇÃO REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS'		
CARACTERISTICA DO ESTUDO: Experimental, categoria C		
OBJETIVOS: Avaliar as consequências do modelo de privação de sono paradoxal (4dias) e restrição parcial crônica de sono (21 dias), bem como os diferentes períodos de recuperação (rebote) da privação ou restrição de sono em diferentes períodos nos parâmetros reprodutivos de ratos machos.		
RESUMO: Serão utilizados 250 ratos Wistar. Anestésico: quetamina. Analgésico: xilazina. Eutanásia: decapitação. Serão constituídos 9 grupos de 15 animais cada: a) CTRL: animais controles mantidos em suas gaiolas de moradia; b) PSP: animais submetidos à privação de sono paradoxal (PSP) por 96 horas; c)PSP-REB48: privação de sono paradoxal por 96 horas e permitidos dormir por 48 horas (rebote) após o período de PSP; f) PSP-REB96:privação do sono paradoxal por 96 horas e permitidos dormir por 96 horas (rebote) após o período de PSP.; e) PSP-REB168: submetidos à privação do sono por 96 horas e permitidos dormir por 168 horas após o período de PSP; f) RS: animais submetidos à restrição parcial crônica de sono por 21 dias; g) RS-REB48: submetidos à restrição parcial por 21 dias e permitidos dormir por 48 horas; h) RS-REB96:restrição parcial do sono por 21 dias e permitidos dormir por 96 horas; i) RS-REB 168: animais submetidos à restrição parcial crônica de sono por 21 dias e permitidos dormir por 168 horas. Os animais serão submetidos à PSP usando o método de plataforma múltipla modificada, que consiste em colocar 10 animais em um tanque de água contendo 14 plataformas circulares . Para restrição de sono, será utilizado esta mesma plataforma, onde os animais ficarão por 18 horas e permitido 6 horas de sono. Será avaliado o comportamento sexual dos animais dos animais, espermograma, peso de testículos e análise hormonal.		
FUNDAMENTAÇÃO RACIONAL: O sono exerce um efeito modulatório importante na maioria dos componentes do sistema endócrino. Tendo em vista as diversas alterações comportamentais e hormonais promovidas pela redução do tempo de sono, este projeto tem como hipótese que essas alterações no sistema endócrino produzidas pela privação de sono aguda ou crônica, como diminuição de testosterona e aumento de glicocorticóides, possam interromper alguma etapa do ciclo espermático em ratos, trazendo consequências graves na perpetuação da espécie.		
MATERIAL E METODO: Estão descritos os procedimentos, estando este projeto inserido na linha de pesquisa da orientadora		
DETALHAMENTO FINANCEIRA: AFIP - R\$ 2750.00		
CRONOGRAMA: 36 meses		
OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado		
PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 01/04/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o termino do estudo		
O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.		
<ol style="list-style-type: none"> 1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto. 2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo. 		
Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj 14. CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil Tel.: (011) 5571-1062 - 5539 - 7162		



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Data: 18-04-2011 19:12:50

Página 2/2

id = 707

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

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