

**Paulo Daubian Rubini dos Santos Nosé**

**UMA NOITE COM 6H DE RESTRIÇÃO DE SONO PIORA A  
PERFORMANCE EM ROEDORES SUBMETIDOS AO  
TREINAMENTO RESISTIDO PERIODIZADO**

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

São Paulo  
2023

**Paulo Daubian Rubini dos Santos Nosé**

**UMA NOITE COM 6H DE RESTRIÇÃO DE SONO PIORA A  
PERFORMANCE EM ROEDORES SUBMETIDOS AO  
TREINAMENTO RESISTIDO PERIODIZADO**

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

**Orientador:**

Prof. Dr. Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

São Paulo

2023

Daubian-Nosé, Paulo

Uma noite com 6h de restrição de sono piora a performance em roedores submetidos ao treinamento resistido periodizado / Paulo Daubian Rubini dos Santos Nosé. – São Paulo, 2023.

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

Título em inglês: A night of 6 hours of sleep restriction worsens performance in rodents subjected to periodized resistance training.

1. Sono. 2. Restrição de sono. 3. Exercício físico. 4. Treinamento de força/resistido.

# **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

## **Chefe do Departamento:**

Prof. Dra. Claudia Berlim de Mello

## **Coordenador do Curso de Pós-graduação:**

Prof. Dr. Carlos Eduardo Neves Girardi

**Paulo Daubian Rubini dos Santos Nosé**

**UMA NOITE COM 6H DE RESTRIÇÃO DE SONO PIORA A  
PERFORMANCE EM ROEDORES SUBMETIDOS AO  
TREINAMENTO RESISTIDO PERIODIZADO**

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

---

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Hanna Karen Moreira Antunes

---

Prof. Dr. Marcos Mônico Neto

---

Prof. Dr. Filipe Antonio de Barros Sousa

---

Prof. Dr. Rodrigo Martins Pereira

---

Data de aprovação: 06 de dezembro de 2023.

## Dedicatória

*Com muito amor, carinho e alegria dedico este trabalho à minha família que perpetuamente me deram apoio moral e financeiro para que pudesse concretizar o título de doutor!*

*Toda e qualquer conquista, não está e nunca estará ao encalço do capital que por eles me foi feito. Sou eternamente grato, e um dia hei de fazer jus a este investimento!*

## Agradecimentos

Este é o sublime momento que posso expressar todo o carinho, alegria e felicidade ao fim de mais um ciclo de minha estrada por esta grande jornada da vida. Nesta presente ocasião sobretudo, posso proferir minhas profundas palavras de gratidão a todos os indivíduos que puderam e fizeram parte efetiva da construção deste trabalho, e que em momento algum poderiam passar em anonimato, pessoas essas que me engrandeceram como profissional e mais do que tudo como ser humano. Errei por diversas vezes durante este processo, mas sempre me foi fomentado a gana do acerto. Os erros serviram como exemplo, mostraram-me como se deve fazer diferente em uma próxima oportunidade. Todavia os acertos, esses sim me colocaram no apogeu mostrando-me que também tenho brio, e que necessito sempre trabalhar para conseguir zelar-me com pés no chão, humildade, e desejo de prosperar o bem, sempre com competência e responsabilidade. Desta forma, sempre preguei e enalteci a palavra gratidão, que segundo o dicionário “é o reconhecimento de algo, pelo bem que nos fez”. Portanto, o supprassumo da minha gratidão será expresso de forma cronológica nos parágrafos abaixo.

DEUS - Glória a Deus, este é o meu pioneiro e mais genuíno agradecimento ao senhor do espaço tempo, por toda saúde, paz, alegria e amor que tenho em minha vida. Aos cosmos expresso minha enorme gratidão por tudo que tenho aprendido e assimilado nestes meus dias de existência e em minha passagem por esta dimensão.

FAMÍLIA - Meus singelos e genuínos votos de gratidão aos meus familiares. Meu pai e meu amado irmão que infelizmente não estão em minha vida com tamanho volume como anos atrás, mas que mesmo à distância torcem por mim e pelo meu sucesso. Minha cunhada e meu sobrinho lindo que fazem parte de minha vida com muita luz e alegria. Aos meus avós, que ajudaram a fundamentar meu caráter e minha dignidade como ser humano, infelizmente três deles estão me olhando junto ao papai do céu, mas ainda tenho o privilégio de ter o carinho de minha avó que aqui está, e absorver o máximo do conhecimento que ela tem a me transmitir. Meus tios, tias, primos, primas e padrinhos que sempre estiveram ao meu lado me dando forças e me proporcionando grandes momentos de convívio, sempre com bons conselhos e um

carinho imenso por mim. Minha namorada que tem sido fiel escudeira principalmente neste último ano de doutoramento, me auxiliando em diversos momentos longe de casa e cuidando de mim após a submissão de um processo cirúrgico que necessitei realizar. E por encerrar os agradecimentos a minha família, nada menos importante minha querida mãe, mamãe, que sempre será o maior dos meus agradecimentos, foi ela quem me deu à luz, me ilumina e ora por mim todos os dias de sua vida, batalha, sofre meus lutos e soleniza minhas vitórias; eu devo a ela tudo o que sou hoje.

COLÉGIO MONTESSORI SANTA TEREZINHA - Vivi os primeiros 17 anos de minha vida dentro do Montessori, então não posso deixar de agradecer o carinho e o cuidado ímpar que todo o quadro de funcionários (desde limpeza e segurança até o financeiro, docentes e diretoria) que sempre se preocuparam com meu crescimento, desenvolvimento e amadurecimento enquanto estive em minha infância e adolescência. E ainda em especial as minhas duas coordenadoras pedagógicas (Branca Denigres Fausto e Ivete Fierro Segabinazzi) que tanto me ensinaram por esta caminhada da vida. Lá pude fazer protuberantes amizades (Piu, Marião, Lenharo, Vitu, Lincoln, Lu, Rafitz) das quais carrego comigo hoje e tenho certeza que carregarei por toda minha passagem pela terra. Amigos verdadeiros que sempre me apoiaram e estiveram comigo nos momentos em que mais precisei.

FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS - Os 4 anos seguintes de minha vida pude aprender a estudar e crescer de uma forma distinta, um pouco mais liberal, sem a supervisão direta de professores. Mas devo muitos agradecimentos ao quadro docente da FMU que me fomentaram, e me forjaram o professor, pesquisador e preparador físico que sou hoje. A graduação (licenciatura e bacharelado em educação física) me proporcionou um enorme crescimento profissional, me trouxe colegas de profissão e amigos incríveis (Vitinho, Magrão, Tárík, Paulinho e Bruno Gion) dos quais tenho certeza que posso contar para toda minha vida. Com a 14/200A pude trocar muitas experiências, ajudar e ser ajudado para a formação de grandes profissionais que estão hoje atuando de forma resplandecente no mercado de trabalho e no meio acadêmico. Devo agradecer em especial à alguns docentes, como os Professores Mes. Mário Augusto Charro e Rodrigo Chaves que sempre me inspiraram com suas didáticas e seus respectivos carismas em sala de aula, tenho meus votos de gratidão

também à quem me orientou com muita atenção no trabalho de conclusão de curso, Professora Me. Ester Francisca Mendes Bôscolo, e também me apresentou ao Professor Me. Gilberto Pantiga Júnior, professor este que não tive a oportunidade de sentar em classe de aula, mas que me ensinou muito nos bastidores e me indicou aos estudos na Universidade Estadual de Campinas e na Universidade Federal de São Paulo.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - Primeiramente devo agradecer a minha orientadora de mestrado, Professora Dra Andrea Maculano Esteves, por me abrir portas dentro da Unicamp, e posteriormente a Professora Me. Miriam Kannebley Frank por ter me ajudado a conquistar espaço no Laboratório de Sono e Exercício Físico que desde o início me recebeu de braços abertos e me proporcionou as melhores experiências possíveis no meio acadêmico e me ensinou a fazer ciência. Agradeço também a todos os membros que frequentaram e ainda frequentam o LASEF com atenção especial para Beatriz da Silva Franco que me acompanhou em meus experimentos e me ajudou muito em atividades laboratoriais. Ao quadro docente em especial as Professoras Dras. Rosangela Maria Neves Bezerra, Adriana Souza Torsoni e Fúlvia de Barros Manchado Gobatto pela colaboração em meu projeto e ao Professor Dr. Luciano Allegretti Mercadante pelos conselhos. Grande agradecimento aos quadros de limpeza, segurança e manutenção (em especial ao Erik e a Marisa) que sempre proporcionaram grande infraestrutura para que eu pudesse desenvolver e me dedicar ao meu projeto de forma integral e consistente. Aos funcionários da DAC que colaboraram com trâmites internos e aos funcionários da cantina, aonde tive muitos momentos de descontração. Agradeço também as amigas que fiz dentro da universidade e que certamente carregarei por toda a vida (Lucas, André, Filipe, Boico, Chadi, Rodrigo, Ivan, Beck, Brícola, Diego, Bolt e Wagner).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - Inicialmente agradeço aos meus colegas André Minari, Leandro Marques, Rodolfo Marinho e Elias França por me auxiliarem dentro das coletas de dados do projeto de doutorado. Agradeço também ao quadro de professores, em especial aos docentes Prof. Dr. Carlos Galduroz, Profa. Dra. Monica Andersen e Profa. Dra Vânia D'Almeida pelos conselhos e disciplinas ministradas e a Profa. Dra. Lila Missae pela colaboração em meu projeto e pela

convivência e recepção comigo em seu laboratório junto ao seu aluno de mestrado Arthur. Grande agradecimento aos colaboradores Karina, Andressa, Vinicius e Gilbertinho, que me auxiliaram com todas as coletas de dados e procedimentos internos. Aos colaboradores Nelson, Dora e Bruno por todo suporte necessário ao longo do processo. Aos quadros de limpeza, segurança e manutenção que sempre proporcionaram infraestrutura para que eu pudesse desenvolver e me dedicar ao meu projeto de forma íntegra e consistente, assim como aos funcionários da secretaria Mara, Ernani, Valeria e Jaque que colaboraram com trâmites internos ao longo de todo o processo de doutoramento.

RONALDO VAGNER THOMATIELI DOS SANTOS - Por final e encerrando com chave de ouro expresso aqui eterna gratidão ao meu orientador do projeto de doutorado, Professor Dr. Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos, ao qual tem sido de notável inspiração para mim tanto academicamente quanto como ser humano. Fui muito bem recebido em um momento delicado e de grande desafio. Me ofertou todo o apoio e condição necessária, me introduziu definitivamente na Unifesp. Me deu forças e não me deixou desistir no momento que fui reprovado no primeiro processo seletivo e em meu processo de qualificação. Hoje mais do que nunca me inspiro na sua forma de encarar o cotidiano, e na sua resolução de problemas. Agradeço por me proporcionar o crescimento como professor e pesquisador, me orientar dentro de debates e críticas enquanto tento ser didático em lecionar, e ao mesmo tempo me auxilia dentro do laboratório com o desenvolvimento da pesquisa. Me motiva e fomenta o meu brio, sem deixar de me chamar a atenção quando necessário, e me dar conselhos de como agir em determinadas situações para proporcionar as melhores tomadas de decisões.

Gratidão em forma de carinho, abraço, beijo, sorriso, alegria ou qualquer outro afeto que traduza a palavra amor. O amor é o elo que nos une, é o que nos faz mais fortes, é o norte da bússola, é onde encontramos a válvula de escape para todo e qualquer problema que tenhamos. Assim sendo, não há momento mais pertinente que este para expressar todo o sentimento de gratidão que tenho para com todas estas pessoas, que fizeram, fazem e sempre farão diferença em minha vida.

Muito Obrigado!

“O presente trabalho foi realizado com apoio à Associação do Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia - (AFIP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”.

*“A simplicidade é a última sofisticação”.*

*(Leonardo da Vinci)*

## Resumo

**Introdução:** O exercício físico é um potente estimulador fisiológico e biomolecular capaz de promover diversas respostas fisiológicas. As respostas fisiológicas advindas do exercício físico são dependentes da carga de treinamento imposta entre cada uma das sessões. Estudos realizados em humanos e modelos animais comprovam que a restrição de sono tem consequências significativas no desempenho físico. **Objetivo:** O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da restrição de sono sobre o desempenho do treinamento resistido, quantificando variáveis bioquímicas e moleculares. **Métodos:** Foram utilizados 30 ratos Wistar machos com 60 dias de idade divididos em quatro grupos (Sedentário Controle (SC; N = 5), Sedentário Restrição de Sono (SRS; N = 5), Treinado Controle (TC; N = 10), e Treinado Restrição de Sono (TRS; N = 10)). Os animais foram submetidos a um teste de força máxima inicial, seguido de um protocolo periodizado de treinamento de força com duração de seis semanas. Posteriormente os animais foram submetidos a um período de seis horas de restrição de sono, com a reavaliação do teste de força máxima. **Resultados:** A presente pesquisa encontrou aumento da massa corporal total de todos os animais ao final das seis semanas de estudo. Seis horas de restrição de sono foi capaz de reduzir 18,4% a capacidade de força do grupo TRS em relação ao grupo TC. Não houve diferenças significativas para os valores de glicogênio entre os grupos experimentais tanto para o músculo plantar, quanto para o músculo sóleo. Não houve diferença significativa para as concentrações da proteína CLOCK nos músculos plantar e sóleo. O trabalho também demonstrou diferença significativa em 15 metabólitos da via de glicólise anaeróbia através da análise metabolômica. **Conclusão:** Concluímos que a restrição de sono atenua o desempenho da capacidade de força máxima em animais treinados, demonstrando também que o processo de treinamento reduz o impacto da restrição do sono no desempenho, alterando diversos metabólitos da via de glicose anaeróbia.

**Descritores:** Sono; Restrição de sono; Exercício físico; Treinamento de força/resistido.

## Abstract

**Introduction:** Physical exercise is a powerful physiological and biomolecular stimulator capable of promoting various physiological responses. The physiological responses arising from physical exercise depend on the training load imposed between each session. Studies carried out in humans and animal models prove that sleep restriction has significant consequences on physical performance. **Objective:** The objective of the present work was to investigate the effects of sleep restriction on resistance training performance, quantifying biochemical and molecular variables. **Methods:** Thirty 60-day-old male Wistar rats were used, divided into four groups (Sedentary Control (SC; N = 5), Sedentary Sleep Restriction (SRS; N = 5), Trained Control (TC; N = 10), and Trained Sleep Restriction (SRT; N = 10)). The animals were subjected to an initial maximal strength test, followed by a periodized strength training protocol lasting six weeks. Subsequently, the animals were subjected to a period of six hours of sleep restriction, with reassessment of the maximum strength test. **Results:** The present research found an increase in the total body mass of all animals at the end of the six weeks of study. Six hours of sleep restriction was able to reduce the strength capacity of the TRS group by 18.4% compared to the TC group. There were no significant differences in glycogen values between the experimental groups for either the plantaris muscle or the soleus muscle. There was no significant difference in CLOCK protein concentrations in the plantar and soleus muscles. The work also demonstrated a significant difference in 15 metabolites from the anaerobic glycolysis pathway through metabolomic analysis. **Conclusion** We conclude that sleep restriction attenuates the performance of maximal strength capacity in trained animals, also demonstrating that the training process reduces the impact of sleep restriction on performance, altering several metabolites of the anaerobic glucose pathway.

**Keywords:** Sleep; Sleep restriction; Physical exercise; Strength/resistance training.

## Sumário

Dedicatória .....	i
Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	viii
Abstract .....	ix
<b>Lista de figuras</b> .....	xii
<b>Lista de tabelas</b> .....	xiii
<b>Lista de abreviaturas, símbolos e siglas</b> .....	xiv
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 - REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 - Cronobiologia em modelo animal e seus efeitos na performance do exercício físico .....	4
2.2 - Privação de sono .....	5
2.3 - Exercício físico anaeróbio .....	7
2.4 - Restrição de sono e exercício físico anaeróbio .....	10
2.5 - O metabolismo glicêmico e glicogênico em resposta ao exercício físico .....	12
2.6 - Treinamento resistido em modelos animais .....	13
2.7 - O gene Clock .....	15
2.8 - Avaliação dos biomarcadores metabólicos .....	17
<b>3 - JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>4 - OBJETIVOS</b> .....	22
4.1 - Objetivo Geral .....	22
4.2 - Objetivos Específicos .....	22
<b>5 - HIPÓTESE</b> .....	23
<b>6 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
6.1 - Animais .....	24

6.2 - Desenho experimental.....	24
6.3 - Adaptação ao exercício físico.....	25
6.4 - Teste de força máxima (TFM) .....	26
6.5 - Periodização.....	27
6.6 - Restrição de sono.....	29
6.7 - Eutanásia.....	29
6.8 - Extração de tecidos .....	30
6.9 - Glicogênio muscular .....	30
6.10 - Extração do soro .....	30
6.11 - Análise metabolômica.....	30
6.12 - Análise estatística.....	32
<b>7 - RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
7.1 - Massa corporal .....	33
7.2 - Teste de força máxima .....	34
7.3 - Glicogênio muscular .....	35
7.4 - Análise metabolômica.....	36
<b>8 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>9 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>11 - ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Representação gráfica do complexo CLOCK:BMAL1 .....	17
<b>Figura 2.</b> Desenho experimental .....	25
<b>Figura 3.</b> Ergômetro de escalada .....	26
<b>Figura 4.</b> Representação da carga de treinamento dos microciclos .....	27
<b>Figura 5.</b> Modelo de periodização linear .....	28
<b>Figura 6.</b> Valores de massa corporal .....	33
<b>Figura 7.</b> Valores de massa corporal .....	34
<b>Figura 8.</b> Valores de força máxima .....	35
<b>Figura 9.</b> Concentração de glicogênio do músculo plantar .....	35
<b>Figura 10.</b> Concentração de glicogênio do músculo sóleo .....	36
<b>Figura 11.</b> <i>Scores Plot</i> .....	37
<b>Figura 12.</b> <i>Variable Importance in Projection</i> .....	38
<b>Figura 13.</b> <i>Orthogonal Principal List Score</i> .....	39
<b>Figura 14.</b> Mapa de calor .....	40
<b>Figura 15.</b> Análise de enriquecimento .....	41
<b>Figura 16.</b> Via de glicose anaeróbia .....	43

**Lista de tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Organização das sessões de treino .....	29
--	----

**Lista de abreviaturas, símbolos e siglas**

<b>Acetil-CoA</b>	Acetilcoenzima A
<b>ADAPT</b>	Adaptação ao exercício físico
<b>AIN</b>	<i>American Institute of Nutrition</i>
<b>AMP</b>	Proteína quinase ativada
<b>AMPK</b>	Proteína quinase ativada por AMP
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>bHLH</b>	Basic helix-loop-helix
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>CCGs</b>	Clock-controlled genes
<b>CEDEME</b>	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CP</b>	Creatina-fosfato
<b>CRY</b>	Cryptochrome
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DM 1</b>	Diabetes melitus 1
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>GK</b>	Glicoquinase
<b>GLUT 4</b>	Glucose transporter-2
<b>GLUT 4</b>	Glucose transporter-4
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible fator 1-alpha
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>kDa</b>	Quilodalto
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>MET 1</b>	Metabólico 1
<b>MET 2</b>	Metabólico 2
<b>MET 3</b>	Metabólico 3

<b>MS</b>	Espectometria de massa
<b>mTOR</b>	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
<b>MyoD1</b>	Myogenic differentiation-1
<b>NACL</b>	Cloreto de sódio
<b>NMR</b>	Ressonância nuclear magnética
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>NSQ</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>OPLS</b>	<i>Orthogonal principal list score</i>
<b>PEPK</b>	Fosfoenolpiruvato-carboxilase
<b>PER</b>	Period
<b>PFK</b>	Fosfofrutoquinase
<b>PGC 1<math>\alpha</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gama coativador-1
<b>Pi</b>	Fosfato inorgânico
<b>PPARs</b>	Peroxisome proliferator-activated receptors
<b>RAST</b>	<i>Runnin-based anaerobic sprint test</i>
<b>RCF</b>	Aceleração centrífuga relativa
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RS</b>	Restrição de sono
<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina
<b>SC</b>	Sedentário controle
<b>SDS</b>	Sulfato dodecil de sódio
<b>SRS</b>	Sedentário restrição de sono
<b>TBS</b>	<i>Tris buffered saline</i>
<b>TC</b>	Treinado controle
<b>TENS</b>	Tensional
<b>TFM</b>	Teste de força máxima
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alpha
<b>TRS</b>	Treinado restrição de sono
<b>UA</b>	Unidades arbitrárias
<b>VIP</b>	<i>Variable importance in projection</i>
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade
<b>VO<sub>2</sub>máx</b>	Volume de oxigênio máximo

## 1 - INTRODUÇÃO

A literatura tem apontado para a importância do exercício físico como estimulador fisiológico e biomolecular capaz de promover uma série de respostas fisiológicas, autonômicas e hemodinâmicas, que cronicamente, podem culminar em adaptações morfofisiológicas específicas (SILVERMAN; DEUSTER, 2014). Contudo, as respostas fisiológicas advindas do exercício físico são tão diretamente dependentes da carga de treinamento imposta (produto final entre: intensidade, volume, densidade e frequência dos estímulos), quanto do tempo de recuperação entre cada uma das sessões de exercício (MANZI *et al.*, 2009). Nesse sentido, métodos foram propostos com o intuito de quantificar tanto a carga diária de esforço, imposta em cada sessão de treinamento, quanto para monitorar as variáveis externas ao exercício físico, como o descanso e o tempo de recuperação entre as sessões de treinamento físico (ALARCON-GOMEZ *et al.*, 2021; MANZI *et al.*, 2009).

No entanto, quando analisamos a literatura científica e a prática clínica da preparação o desempenho de força muscular, resistência e velocidade, podem ser afetados pela restrição do sono, além de acarretar outras variáveis de recuperação musculoesqueléticas (CHAREST; GRANDNER, 2020; HALSON; JULIFF, 2017). A explicação de alguns mecanismos fisiológicos para a redução do desempenho através da restrição de sono podem ser explicados através da redução da atividade enzimática, aumento da inflamação e reduções na reparação tecidual (DATTILO *et al.*, 2011; EL-KADER; AL-JIFFRI, 2019; JÓWKO *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2006; LE MOINE *et al.*, 2011; VONDRA *et al.*, 1981).

Pode-se associar estas perdas à reposição energética através da depleção dos estoques de glicogênio acarretados pela privação de sono (SKEIN *et al.*, 2011). Tendo em vista o alto nível de intensidade nos exercícios anaeróbios, podemos citar a demanda energética suprida em predominância pelo metabolismo bioenergético glicolítico, onde reservas de glicose muscular tem papel importante no desempenho (BAKER *et al.*, 2016). Dito isso, o glicogênio muscular por sua vez exerce papel fundamental no desempenho, portanto, pode se dizer que quando sua depleção é causada pela restrição de sono, aumenta-se a queda do rendimento anaeróbio (IVY, 1991; LACOMBE *et al.*, 1999; SKEIN *et al.*, 2011).

Ao longo dos anos, estudos realizados em humanos e modelos animais comprovam e demonstram claramente que a restrição de sono tem consequências

significativas no desempenho físico (AJJIMAPORN *et al.*, 2020; CHASE *et al.*, 2017; DEAN *et al.*, 2023; GIAMPA *et al.*, 2016; MAH *et al.*, 2019; ROMDHANI *et al.*, 2019). Os estudos demonstram com bastante clareza, que os exercícios anaeróbios e/ou de alta intensidade são prejudicados por consequência da restrição de sono aguda assim como ao longo de dias consecutivos (AJJIMAPORN *et al.*, 2020; CHASE *et al.*, 2017; DEAN *et al.*, 2023; GIAMPA *et al.*, 2016; MAH *et al.*, 2019; ROMDHANI *et al.*, 2019).

O treinamento resistido é uma das formas de desenvolvimento da capacidade de força em modelos animais (HORNBERGER; FARRAR, 2004; LIMA *et al.*, 2019; NEVES *et al.*, 2016). O aumento da capacidade de força em diferentes proporções após processos de treinamento físico distintos tem se mostrado eficientes (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016; DUNCAN *et al.*, 1998; HORNBERGER; FARRAR, 2004; LIMA *et al.*, 2019). O que tem-se observado é a magnitude do aumento de força nos modelos animais através de protocolos de treinamento resistido mais simples, ou utilizando periodizações complexas com controle e monitoramento da carga de treinamento (DE CARVALHO *et al.*, 2023; HORNBERGER; FARRAR, 2004; LIMA *et al.*, 2019). O aumento da capacidade de força, da área de secção transversa dos músculos trabalhados, assim como a captação e transporte de glicose são os maiores achados dos estudos com protocolos de seis a doze semanas de treinamento resistido em modelos animais (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016; DUNCAN *et al.*, 1998; HORNBERGER; FARRAR, 2004; LIMA *et al.*, 2019; NEVES *et al.*, 2016).

Devido às limitações éticas e como tentativa de atenuar as inúmeras interferências internas e externas nas adaptações morfofuncionais, os estudos acerca da fisiologia do exercício vêm, há muito tempo, utilizando animais de laboratório, para tentar simular os efeitos do exercício físico em humanos (GEENEN *et al.*, 1988), com intuito de compreender mais profundamente os mecanismos sistêmicos, celulares e moleculares responsivos ao esforço (CARVALHO-FILHO *et al.*, 2005; LAMBERTUCCI *et al.*, 2007). Entretanto, apesar de inúmeros estudos utilizarem animais para entender os mecanismos fisiológicos e biomoleculares, ainda são pouco explorados, os efeitos da restrição de sono nos modelos animais, o que pode justificar um grande número de estudos a não utilizar as melhores estratégias para investigar os efeitos do exercício físico, agudo ou cronicamente, como um estimulador terapêutico não-farmacológico contra as mais diversas condições patológicas que são diretamente correlacionadas com a qualidade ou privação do sono, bem como visando também o

aumento da performance em atletas sob atividade competitiva. Dessa forma, buscamos desenvolver um protocolo de treinamento resistido para mimetizar os efeitos produzidos nos seres humanos, posteriormente a realização de um teste de força máxima voluntária e análises bioquímicas/moleculares com intuito de observar os resultados do projeto e seu desfecho, contribuindo assim com novas ideias e direcionando os próximos estudos que investiguem a restrição de sono e a perda de desempenho de força.

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 - Cronobiologia em modelo animal e seus efeitos na performance do exercício físico

Seguindo a linha de raciocínio de que o exercício promove diversos efeitos no organismo à fim de provocar uma nova condição de homeostase, é cada vez mais importante a diminuição dos vieses que podem contribuir para uma interpretação errada de resultados obtidos. Dessa forma, apesar de há muito tempo ser utilizado experimentos com modelo animal como forma de estudar a fisiologia do exercício, a maioria dos estudos negligencia a cronobiologia dos animais, sabendo-se que roedores possuem hábitos noturnos (BECK; GOBATTO, 2013). Estes autores ainda demonstram que, frente a uma sessão de exercício físico, a performance dos animais é muito mais eficiente à noite em relação ao dia. Mediante a esses dados, os autores sugerem que a maior temperatura corporal e atividade espontânea dos animais, além do menor estresse devido à manipulação ser empregada no período de vigília, induzem a maior tolerância frente ao esforço. Dessa forma, torna-se necessário levar em consideração o ritmo circadiano que os roedores apresentam, pois, apesar da grande semelhança entre humanos e animais como resposta ao exercício físico, ratos e camundongos possuem algumas características ímpares quando comparados à humanos, como este apresentado.

Portanto, entende-se que, além da manipulação entre volume e intensidade, a hora do dia em que esse estímulo é empregado, bem como às condições ambientais e de luminosidade, são importantes parâmetros, que podem alterar ou autenticar os resultados encontrados dos efeitos do exercício sobre o metabolismo. Nesse sentido, BECK; BOTEZELLI; *et al.* (2015) utilizaram uma impressionante metodologia, controlando o ciclo circadiano dos animais através da realização do exercício físico durante o período noturno, com uma iluminação constante através de um espectro vermelho, que não ultrapassa 15 lux de incandescência (BECK; BOTEZELLI; *et al.*, 2015; BECK *et al.*, 2014). Em adição, o sistema ainda foi devidamente posicionado, para que a distância entre o foco luminoso e a posição na qual os animais realizavam o exercício de natação fosse semelhantes para todos os grupos, proporcionando a mesma luminescência individualmente proporcionalizada (BECK; DANTAS; *et al.*, 2015). E, por meio de seus achados, os autores sugerem que os animais não sejam submetidos a sessões de exercício físico em condições estressantes, ou seja, de que

quaisquer protocolos que envolvam o exercício físico em animais roedores, sejam realizados durante o período noturno e sob a iluminação adequada.

## 2.2 - Privação de sono

Privação de sono, como o próprio nome já diz, é a eliminação do sono por um período mínimo de uma noite, prolongando significativamente a vigília (REYNOLDS; BANKS, 2010). De acordo com (DA COSTA SOUZA; RIBEIRO, 2015) algumas das consequências da privação do sono incluem déficits cognitivos, inflamação, comprometimento geral da síntese de proteínas, desequilíbrio metabólico e desregulação térmica. Em um trabalho pioneiro, VONDRA *et al.* (1981) estudaram a privação de sono em sete homens saudáveis ao longo de 120h. Os resultados do estudo demonstraram redução da atividade enzimática, em especial, uma diminuição significativa na atividade da malato desidrogenase, citrato sintase, glicerol-3-fosfato desidrogenase e lactato desidrogenase, que são enzimas importantes na via de sinalização de glicólise anaeróbia. Anos mais tarde, o estudo de JÓWKO *et al.* (2018) teve o intuito analisar mudanças no estresse oxidativo e nos marcadores de dano muscular durante um treinamento de sobrevivência de 36 horas combinado com privação de sono. O estudo demonstrou que o treinamento de sobrevivência prejudica a defesa antioxidante enzimática, aumenta a peroxidação lipídica e induz dano muscular. SANER *et al.* (2021) demonstraram em seu estudo com 24 seres humanos adultos saudáveis que um período de restrição de sono de cinco noites leva a reduções na função respiratória mitocondrial, na síntese de proteínas sarcoplasmáticas e na amplitude da temperatura da pele, com uma redução concomitante na tolerância à glicose. Portanto, juntos esses estudos sugerem que a privação de sono contribui negativamente no metabolismo energético (funcionamento do metabolismo energético), bem como na preservação estrutural das células.

AL KHATIB *et al.* (2017) conduziram uma revisão sistemática e meta-análise de estudos de intervenção humana avaliando os efeitos da privação de sono na ingestão calórica e gasto de energia. O resultado do estudo demonstrou que a privação de sono aumentou a ingestão calórica, sendo esse aumento acompanhado por ingestão significativamente maior de gordura e menor ingestão de proteína, todavia sem efeito na ingestão de carboidratos, a longo prazo podendo contribuir com o ganho de peso. Nota-se através dos estudos citados que existe uma relação

evidente entre oscilações de peso corporal, em especial com ganhos elevados de gordura em proporção a quantidade de massa muscular. WANG *et al.* (2018) avaliaram seres humanos adultos com sobrepeso ou obesos em regime de restrição calórica com e sem restrição de sono ao longo de oito semanas, demonstrando que aproximadamente uma hora de restrição de sono em cinco noites por semana levou ambos os grupos a perderem quantidades semelhantes de peso. No entanto, a proporção de massa total de gordura perdida foi significativamente maior no grupo sem restrição de sono.

BRIANZA-PADILLA *et al.* (2016) realizaram um estudo que consistiu na privação do sono de 24, 96 ou 192h em ratos machos Wistar, demonstrando uma diminuição progressiva do peso corporal com o aumento da duração da privação, sendo esta, responsável pela hipoglicemia basal em todos os períodos de tempo avaliados com aumento dos níveis de corticosterona após 192h de privação. De acordo com (VAN CAUTER *et al.*, 2008) quando a qualidade e a duração do sono não estão devidamente ajustados, há redução da concentração sérica de hormônio do crescimento, grelina, leptina e elevação da concentração de cortisol. LAMON *et al.* (2021) realizaram um estudo com seres humanos adultos jovens saudáveis submetidos a uma noite de privação total de sono, concluindo que a privação induz resistência anabólica, reduzindo a síntese de proteína muscular pós-prandial. Além disso, nota-se efeitos que recaem sobre o metabolismo dos carboidratos, incluindo diminuição da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina (LEPROULT; CAUTER, 2010). Dito isso, é de se observar os fatos sobre os estudos citados demonstrarem as diversas circunstâncias que incluem a privação de sono, alterações nos níveis de diversos hormônios e na glicemia geral.

TSERETELI *et al.* (2022) conduziram um estudo com seres humanos adultos saudáveis ao longo de 14 dias, verificando que a baixa eficiência do sono e rotinas tardias no horário de dormir estão associados a um pior controle glicêmico pós-prandial no café da manhã do dia seguinte. BROUWER *et al.* (2020) investigaram os efeitos de uma noite de privação total de sono no metabolismo em um modelo animal canino, demonstrando que apenas uma noite de privação total de sono prejudicou a sensibilidade à insulina em um grau semelhante a 9 meses de alimentação crônica com alto teor de gordura. Estas alterações fisiológicas, podem refletir em prejuízos nas funções reparadoras do sono, como por exemplo, na reposição dos estoques de

carboidrato na forma de glicogênio hepático e muscular (SKEIN *et al.*, 2011). DA SILVA *et al.* (2022) realizaram um estudo com camundongos Swiss privados de sono comparando com animais controle e um terceiro grupo de exercício físico, encontrando aumento nas concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e reduções nas concentrações de proteína de muito baixa densidade (VLDL) após um período de oito semanas. Fica clara a participação negativa da privação do sono em relação ao metabolismo lipídico e glicêmico, através de mudanças consideráveis no controle das lipoproteínas, reposição dos estoques de carboidrato e sensibilidade à insulina.

### 2.3 - Exercício físico anaeróbio

O metabolismo bioenergético anaeróbio utiliza mecanismos distintos para a produção de ATP, sendo assim, a energia química transferida em energia mecânica se dá através de ligações via ATP-CP ou pelo processo de glicólise anaeróbia (SCOTT *et al.*, 2006). A glicólise anaeróbia, utiliza como substrato a glicose que pode ser proveniente do sangue ou do glicogênio muscular. O glicogênio é um polímero ramificado que consiste em uma forma de armazenamento prontamente mobilizada de glicose (IVY, 1991). Sendo assim, os estoques de glicogênio vão se esgotando conforme o prolongamento da sessão de exercício físico (BAKER *et al.*, 2016). BECK *et al.* (2014) utilizou a natação para estimar o tempo de exaustão na intensidade do limiar anaeróbio em ratos Wistar, demonstrando diminuição significativa da glicemia quando o grupo exercitado foi comparado ao grupo controle, encontrando também severa depleção de glicogênio muscular e hepático ao longo do experimento. Os mecanismos que atuam em conjunto para a produção de energia de forma anaeróbia são limitados, podendo depender em algum momento da sessão de treinamento do próprio metabolismo aeróbio.

Não obstante, DE ARAUJO *et al.* (2015) compararam dois modelos de treinamento em ratos Wistar, sendo um deles contínuo (aeróbio) e o outro intervalado (anaeróbio), ambos baseados no limiar anaeróbio dos animais. Os resultados demonstraram uma adaptação positiva em que o grupo intervalado (anaeróbio) apresentou supercompensação de glicogênio 48h após o treino em relação ao grupo controle e ao grupo contínuo (aeróbio). Em um outro estudo, o mesmo grupo de pesquisadores realizaram um experimento com sessões de treinamento intervalado

em 50 ratos Wistar ao longo de 12 semanas. As duas avaliações (semana 6 e semana 12) demonstraram aumento do glicogênio muscular (gastrocnêmio) em comparação com o momento basal. O glicogênio hepático por sua vez demonstrou aumento somente após a décima segunda semana em relação ao momento basal (DE ARAUJO *et al.*, 2016). Dessa forma, entende-se que o conteúdo de glicogênio intramuscular antes do exercício, está diretamente relacionado ao seu estado de preservação. Ou seja, se a ingestão de carboidratos ocorrer após o esgotamento dos estoques, através do exercício físico intenso, o glicogênio pode aumentar - fenômeno denominado de “supercompensação”, o qual sabidamente é encontrado após períodos de exercícios anaeróbios de alta intensidade, e de magnitudes distintas, em relação à depleção dos estoques de glicogênio nos diferentes tecidos de armazenamento do polímero: musculares e hepático (MURRAY; ROSENBLOOM, 2018).

Olhando por outro prisma, podemos notar o trabalho de KASAI *et al.* (2021), que realizaram um experimento com dez homens velocistas universitários sob condições de hipóxia e normóxia, concluindo que uma única sessão de treinamento intervalado de *Sprint* (três *sprints* de 30 seg) em hipóxia causou uma maior diminuição no conteúdo de glicogênio muscular em comparação com o mesmo exercício em normóxia, sem interferir na produção de energia. De acordo com LACOMBE *et al.* (1999) quando os estoques de glicogênio começam a se esgotar, verifica-se um comprometimento do metabolismo anaeróbio. Portanto, nota-se que quanto maior for a condição anaeróbia (normóxia vs hipóxia), maior será a depleção de glicogênio para produção de energia.

Inicialmente, a energia mecânica advinda da transferência de energia química, se dá através de ligações via ATP-CP (Scott *et al.*, 2006). BANGSBO *et al.* (2001) sugerem que a taxa de ressíntese de ATP aumenta em uma taxa de trabalho constante ao longo do exercício intenso. Ainda assim, a eficiência mecânica diminui à medida que o exercício intenso se prolonga. Durante a contração muscular de alta intensidade, o ATP é fornecido em taxas quase máximas pela degradação da creatina fosfato e glicólise, no entanto, à medida que a duração do exercício aumenta, a contribuição da ressíntese de ATP para o fornecimento de energia diminui devido ao esgotamento dos estoques de creatina fosfato e uma redução na taxa de glicogenólise, que juntos podem ser responsáveis pela redução paralela na produção de força muscular e produção de energia (GREENHAFF; TIMMONS, 1998). Isso fica

mais claro quando notamos que o trabalho de CHASIOTIS *et al.* (1987) faz a sugestão de que a diminuição na geração de força no exercício intermitente se deve ao maior gasto energético para a contração resultando em maiores alterações no meio intracelular com diminuição de ATP e aumento de íons H<sup>+</sup> e Pi. Portanto, esses estudos mostram a importância e a contribuição da glicólise anaeróbia via ATP-CP para a produção de energia ao longo do tempo total de exercício físico.

Seguindo essa linha de raciocínio, GOROSTIAGA *et al.* (2010) avaliaram seis homens não atletas em um teste de dez repetições máximas do exercício *leg press* bilateral, os resultados mostram que durante as primeiras 5 repetições o ATP é ressintetizado predominantemente da creatina fosfato com uma menor contribuição da glicólise, enquanto nas segundas 5 repetições esse padrão é invertido, ou seja, a ressíntese anaeróbica de ATP é produzida principalmente pela glicólise. Os autores também sugerem que ao longo das repetições, a produção de energia é reduzida, diminuindo a velocidade da contração muscular, reduzindo assim a demanda de energia, mas não o suficiente para equilibrar a produção e utilização de ATP, devido ao comprometimento da eficiência mecânica com a fadiga. GRAY *et al.* (2011) avaliaram homens ciclistas que executaram seis minutos de exercício intenso em condições térmicas consideradas normais, e em condições de temperatura elevada. Após a biópsia e a análise dos dados, a presente investigação demonstrou que a elevação passiva da temperatura do músculo alvo exercitado antes da realização de exercícios intensos resulta em aumento do *turnover* (ressíntese) anaeróbio de ATP, sem haver diferenças no glicogênio muscular, durante os dois primeiros minutos de exercício.

Os estudos descritos no último parágrafo aprofundam a utilização do ATP como fonte de energia, podendo fomentar possíveis utilizações como recursos ergogênicos. Tendo isso em vista, o trabalho de JORDAN *et al.* (2004), decidiu suplementar ATP via oral em 27 homens saudáveis, e realizar dois testes de performance. As análises estatísticas não mostraram efeitos significativos para ATP no sangue total ou concentrações plasmáticas de ATP para qualquer condição de tratamento. Todavia notaram efeitos ergogênicos no teste de força muscular. Sendo assim, podemos notar que a utilização do componente externo de ATP como recurso ergogênico para estimular a via glicolítica/ATP-CP não parece resultar em adaptações metabólicas no exercício físico.

#### 2.4 - Restrição de sono e exercício físico anaeróbio

A restrição de sono (RS) pode afetar o desempenho físico de força muscular, resistência e velocidade, dentre outras variáveis de recuperação musculoesquelética (CHAREST; GRANDNER, 2020; HALSON; JULIFF, 2017). Diferentes estudos demonstraram perda de capacidades físicas de força e velocidade em atletas e indivíduos treinados (LEGG; PATTON, 1986; MAH *et al.*, 2019; SKEIN *et al.*, 2011). Tais prejuízos, podem estar associados à perda de reposição energética, uma vez que observa-se concomitante depleção dos estoques de glicogênio nos atletas quando eles são apenas restritos de sono (Skein *et al.*, 2011). Assim, estas alterações fisiológicas podem explicar a perda de desempenho físico comumente observada após restrição de sono (BULBULIAN *et al.*, 1996; SOUISSI *et al.*, 2003).

CHASE *et al.* (2017) realizaram um estudo com sete ciclistas amadores e observaram que uma única noite de restrição de sono teve consequências marcantes no desempenho de tempo total ao longo de 3 km na manhã seguinte. Seguindo a mesma linha de estudo, DEAN *et al.* (2023) conduziram um experimento com 10 ciclistas, demonstrando que a restrição do sono reduz o desempenho ao longo de dias consecutivos de exercício em uma variedade de testes relevantes para pista e estrada. MAH *et al.* (2019) investigaram a restrição de sono por dias consecutivos em atletas de elite de ciclismo. Os resultados do presente estudo demonstraram que dias consecutivos de restrição de sono diminuem o salto vertical máximo, aumentaram a variabilidade da coordenação e prejudicaram o tempo de resposta psicomotora em atletas de elite. Além disso, verificou-se que o aumento da variabilidade da coordenação está associado ao aumento da lentidão do tempo de resposta psicomotora.

ROMDHANI *et al.* (2019) realizaram um estudo com 14 atletas de Judô utilizando um teste de sprint anaeróbio (RAST) e restrição de sono. Os resultados do estudo demonstraram que o exercício após um sono noturno “subótimo” não só resulta em déficit de desempenho, mas também leva a uma maior inflamação sistêmica. AJJIMAPORN *et al.* (2020) avaliaram em seu estudo 11 jogadores de futebol universitário, demonstrando que a restrição de 3h de sono acarretou em uma diminuição da potência e capacidade anaeróbia no RAST teste, bem como na diminuição da força muscular no teste de força muscular isométrica medida pelo

dinamômetro. Tomados em conjunto, todos esses estudos deixam claro que independentemente do tipo de exercício anaeróbio praticado em níveis elevados e/ou alta intensidade, haverá prejuízo pela restrição do sono aguda e também ao longo de dias consecutivos.

Estudar mecanismos em seres humanos requer técnicas invasivas, o que do ponto de vista ético é sempre mais difícil, por isso a importância da realização dos estudos com modelos animais. A restrição de sono e o treinamento físico em modelos animais, em especial os roedores, tenta mimetizar, extrapolando na medida do possível o modelo humano. GIAMPA *et al.* (2016) realizaram um estudo com 120 ratos Wistar divididos em grupos com e sem treinamento resistido, adicionando a privação de sono. Os resultados do trabalho demonstraram que o treinamento resistido efetivamente atenua a disfunção cardíaca e o desequilíbrio hormonal induzido pela privação do sono. MONICO-NETO *et al.* (2017) realizaram um estudo com 50 ratos Wistar, com o intuito de verificar alterações subjacentes à atrofia muscular induzida pela privação de sono e o impacto dessa condição em ratos previamente submetidos a treinamento resistido. Os pesquisadores encontraram que o treinamento resistido de alta intensidade realizado antes da privação de sono foi benéfico em conter a taxa de perda muscular induzida pela própria privação. O treinamento também minimizou o sinal catabólico e aumentou a atividade de síntese proteica, atenuando assim a perda de peso corporal.

Além disso, alguns outros possíveis mecanismos fisiológicos podem explicar a redução do desempenho causado pela restrição de sono, dentre eles estão: a redução da atividade enzimática (JÓWKO *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2006; LE MOINE *et al.*, 2011; VONDRA *et al.*, 1981), aumento da inflamação (CHENNAOUI *et al.*, 2021; EL-KADER; AL-JIFFRI, 2019) e reduções na reparação tecidual (DATTILO *et al.*, 2011).

Considerando que em esforços de alta intensidade, a demanda energética é suprida predominantemente pelo metabolismo glicolítico, as reservas de glicose muscular desempenham um papel preponderante no desempenho físico durante exercícios de força (BAKER *et al.*, 2016). Assim, o glicogênio muscular tem papel fundamental no desempenho (IVY, 1991; LACOMBE *et al.*, 1999), e por tanto, acredita-se que sua depleção causada pela restrição de sono, pode acentuar a perda de desempenho em esforços de alta intensidade (SKEIN *et al.*, 2011).

## 2.5 - O metabolismo glicêmico e glicogênico em resposta ao exercício físico

A regulação do metabolismo da glicose e dos estoques de glicogênio tem sido extensivamente estudada na literatura científica. BERGSTROM e HULTMAN (1967) demonstraram que a ressíntese de glicogênio ocorre principalmente nos músculos exercitados, sem afetar outros grupos musculares. Além disso, um estudo adicional destacou que os estoques de glicogênio nos músculos primariamente exercitados são determinantes para o desempenho durante o exercício (SKEIN *et al.*, 2011).

REN *et al.* (1994) investigaram o metabolismo intracelular de glicose e o papel do transportador GLUT4 durante o exercício. Durante o exercício, os estoques intracelulares de GLUT4 se deslocam para a membrana celular, aumentando a disponibilidade de glicose como fonte de energia. No entanto, o aumento na demanda energética e a entrada de glicose nas células musculares podem esgotar os estoques de glicogênio hepático, levando à hipoglicemia e fadiga (JENSEN *et al.*, 2011).

Uma adaptação do treinamento físico é a promoção da biogênese mitocondrial, o que aumenta a capacidade das mitocôndrias para oxidar ácidos graxos, prolongando assim a utilização do glicogênio e melhorando o desempenho (MARGOLIS; PASIAKOS, 2013). É importante ressaltar as reservas de glicogênio limitadas no organismo, em comparação com as reservas de lipídios mais abundantes. Assim, um exercício de intensidade moderada e duração adequada pode promover modificações benéficas nos níveis de HDL e LDL-colesterol, melhorando o perfil lipídico (MANN *et al.*, 2014).

A preferência pelo metabolismo da glicose ou dos lipídios durante o exercício continua sendo um tópico debatido. A hipótese mais aceita é que a demanda energética do exercício regula essa preferência, por meio do "Ciclo de Randle", em que o acúmulo de citrato inibe a atividade da fosfofrutoquinase (PFK), diminuindo o fluxo glicolítico, enquanto o aumento nas concentrações de AMP diminui esse efeito inibitório da PFK, favorecendo o uso da glicose como fonte de energia (HUE; TAEGTMEYER, 2009).

Além disso, estudos em animais, como o de MACDONALD *et al.* (2016), exploraram os efeitos do exercício de alta intensidade na regulação do glicogênio hepático em modelos de diabetes. A suplementação com L-Carnitina, conforme demonstrado por PANDAREESH e ANAND (2013), pode aumentar a resistência à fadiga, minimizar o uso do glicogênio hepático e melhorar o desempenho.

Por fim, atualmente, estudos vêm sendo explorados no intuito de encontrar, no exercício físico, um potente estimulador não-farmacológico no tratamento de diversas condições patológicas (AMBROSE; GOLIGHTLY, 2015; PEDERSEN; SALTIN, 2015; RIBARIC, 2022). MACDONALD *et al.* (2016), estudou em animais com DM1, os efeitos glicorregulatórios em resposta ao exercício de alta intensidade. Após 10 semanas de treinamento físico, os autores não encontraram um aumento nos estoques de glicogênio hepático, no entanto, encontraram um aumento na atividade de proteínas responsáveis pela glicogênese hepática, como a glicoquinase (GK) e a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK). Esses resultados contraditórios, sugerem que outros fatores estão envolvidos na melhora dos estoques de glicogênio hepático, e que esses fatores podem estar alterados em animais diabéticos. Todos esses dados, nos sugerem que, além dos mecanismos intracelulares frente a patologias e comorbidades, é necessário também entender os mecanismos intracelulares que são regulados por cada intensidade de exercício, especialmente àquelas próximas à zona de transição metabólica (limiar anaeróbio), tanto de forma crônica, mas especialmente de forma aguda. Dessa forma, possibilitando um maior subsídio científico a toda comunidade acadêmica e profissional.

## 2.6 - Treinamento resistido em modelos animais

Uma das formas de desenvolvimento da capacidade de força em modelos animais é através do treinamento resistido (HORNBERGER; FARRAR, 2004; LIMA *et al.*, 2019; NEVES *et al.*, 2016). Ao longo dos anos, diversos estudos têm mostrado aumento da capacidade de força em diferentes magnitudes após períodos distintos de treinamento resistido (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016; DUNCAN *et al.*, 1998; HORNBERGER; FARRAR, 2004; LIMA *et al.*, 2019). Tendo em vista que o aumento de força é observado nos estudos com o passar do tempo, o que a literatura tem mostrado são os diversos tipos de protocolos de treinamento resistido, utilizando metodologias mais simples, ou periodizações mais complexas com controle e monitoramento da carga de treinamento em modelos animais (DE CARVALHO *et al.*, 2023; HORNBERGER; FARRAR, 2004; LIMA *et al.*, 2019).

DUNCAN *et al.* (1998) realizaram um estudo inicial para determinar se o treinamento de resistência em alta intensidade e de longo prazo causaria adaptações na estrutura e função do músculo esquelético de ratos. No estudo, foram utilizados

ratos Wistar jovens, e os pesquisadores demonstraram que quatro sessões de treino com quatro séries de 12-15 repetições por semana ao longo de 26 semanas foram responsáveis por aumentar a capacidade de força destes animais em relação ao período inicial. (HORNBERGER; FARRAR, 2004) em uma tentativa de desenvolver um modelo animal que mimetiza o exercício de resistência progressiva em humanos, demonstraram através do Teste de Força Máxima aumento de 287% na capacidade de força de animais Sprague Dawley submetendo-os ao treinamento resistido uma vez a cada três dias ao longo de oito semanas. O estudo (NEVES *et al.*, 2016) examinou os efeitos de dois protocolos de treinamento resistido realizados em diferentes sobrecargas de peso máximo em ratos espontaneamente hipertensos. Os animais foram treinados três vezes por semana em dias não consecutivos ao longo de 12 semanas, realizando de seis a oito escaladas com 10-12 repetições, demonstrando através do Teste de Força Máxima o mesmo aumento de 140% na capacidade de força citados anteriormente por DUNCAN *et al.* (1998). Posteriormente, ANTONIO-SANTOS *et al.* (2016) em seu estudo, avaliaram os efeitos do treinamento resistido no desempenho de um teste semanal de sobrecarga máxima, demonstrando que cinco sessões de treino por semana ao longo de oito semanas com 10 séries de 10-16 escaladas foram suficientes para aumentar 238% na capacidade de força de Ratos Wistar adultos. Quando se variam protocolos de treinamento entre oito e doze semanas, os estudos demonstram claramente um aumento significativo na capacidade de força dos animais (140 a 287%) ao longo do treinamento resistido em comparação aos seus momentos iniciais.

DE CARVALHO *et al.* (2023) realizaram um estudo com 28 ratos Wistar, os pesquisadores utilizaram um protocolo de 12 semanas de treinamento resistido, totalizando 36 sessões de treino com quatro a nove escaladas por treino. Os animais foram inicialmente submetidos ao teste de força máxima, e, ao final do protocolo de treinamento, o teste foi realizado novamente. Os resultados demonstraram aumento da capacidade de força no grupo submetido ao treinamento resistido em relação ao grupo controle, bem como o aumento da razão entre peso corporal e área de secção transversa muscular. PADILHA *et al.* (2019) investigaram dois tipos diferentes de protocolos de treinamento resistido (intensidade moderada vs intensidade vigorosa) e suas respostas na força muscular e hipertrofia. Foram utilizados 20 animais Wistar, ambos os grupos realizaram um teste de força máxima e posteriormente treinaram ao

longo de seis semanas em seus respectivos protocolos (grupo intensidade moderada treinou com quatro séries em peso gradativo [50, 75, 90, 100%], e o grupo intensidade vigorosa treino com 8-16 séries com peso gradativo [70, 80, 85%]). Os resultados do estudo demonstraram que ambos os protocolos de treinamento resistido induziram a hipertrofia muscular e aumentaram a capacidade de força dos animais em relação ao grupo controle. YASPELKIS *et al.* (2002) realizaram um estudo com o objetivo de determinar se o treinamento resistido melhora a captação e o transporte de glicose no músculo esquelético de roedores. Para tal estudo foram utilizados 23 Ratos Sprague-Dawley, realizando três sessões de treino por semana ao longo de 12 semanas com três séries de 10 repetições. Os achados sugerem que tanto o exercício resistido pode melhorar a captação e o transporte de glicose no músculo esquelético estimulado pela insulina, com adaptações restritas aos músculos recrutados para o desempenho do exercício. Nota-se que protocolos de seis a doze semanas de treinamento resistido em modelos animais, além de promover o aumento da capacidade de força, também promovem o aumento da área de secção transversa dos músculos estimulados, gerando hipertrofia, bem como aumentando a captação e transporte de glicose.

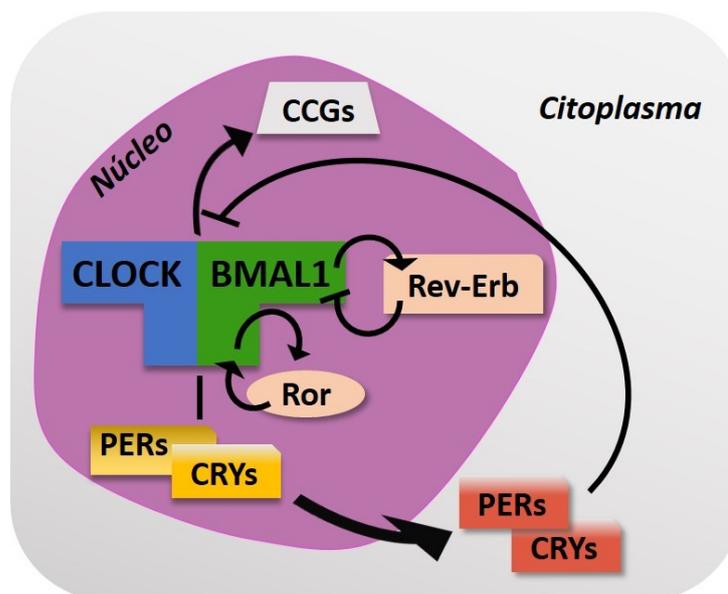
## 2.7 - O gene Clock

Em 1994 o fator de transcrição CLOCK foi descoberto, mapeado e clonado VITATERNA *et al.* (1994). No ano de 1997 dois grupos de pesquisa sequenciaram em tempo similar um novo fator de transcrição que posteriormente foi denominado BMAL1 (HOGENESCH *et al.*, 1997; IKEDA; NOMURA, 1997). GEKAKIS *et al.* (1998) identificaram BMAL1 como componente do relógio circadiano, definindo uma função bioquímica importante para o fator de transcrição CLOCK, como heterodímeros. BMAL1 por sua vez é expressa em um padrão circadiano tanto no núcleo supraquiasmático quanto nos tecidos periféricos (DAMIOLA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2011).

De acordo com GALLUZZI *et al.* (2015) em nível molecular, tanto central quanto periférico, existem dois fatores de transcrição denominados como “Complexo CLOCK:BMAL1” (Figura 1). Esse complexo de fatores de transcrição tem como característica estrutural a *basic helix-loop-helix* (bHLH), em que se heterodimerizam no núcleo ativando genes da família PER (*Period*), CRY (*Cryptochrome*) que são os principais fatores no desempenho no papel dominante de regulação do ciclo de

vigília/sono e também os *clock-controlled* genes (CCGs) como as proteínas conhecidas como *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1* (PGC 1 $\alpha$ ), *Hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF1 $\alpha$ ), *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs), *Glucose transporter-2* (GLUT2) e *Myogenic Differentiation-1* (MyoD1), sendo todas essas proteínas, sabidamente responsáveis por controlar inúmeras funções metabólicas, tão quanto forma aguda, como de maneira crônica (BOZEK *et al.*, 2009; BOZEK *et al.*, 2007; HARFMANN *et al.*, 2015; MAZZOCCOLI *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2017). Segundo MENET *et al.* (2014) o *feedback* circadiano pode controlar diretamente a regulação temporal da cromatina de genes alvo e modular a ativação transcricional de outros genes.

Em mamíferos, a regulação do ciclo de *feedback* transcricional-tradutor consiste entre o equilíbrio fisiológico entre a síntese e ativação dos ativadores transcricionais CLOCK:BMAL1 (cérebro e músculo) e os complexos repressores PER1/PER2 e CRY1 /CRY2. O complexo CLOCK:BMAL1 ativa a expressão dos genes PER e CRY. O complexo PER/CRY periodicamente se retroalimenta suprimindo a atividade de CLOCK/BMAL1, inibindo sua própria transcrição. Os receptores de hormônio nuclear Rev-Erb (inibidor) e Ror (ativador) formam um *loop* estabilizador adicional com CLOCK;BMAL1 para refinar a precisão do relógio, enfatizando para a ativação dos CCGs pelo complexo CLOCK:BMAL1 (DUDEK; MENG, 2014; HARFMANN *et al.*, 2015; HARFMANN *et al.*, 2016; SCHRODER; ESSER, 2013).



**Figura 1.** Representação gráfica do complexo CLOCK:BMAL1

Sabe-se que o relógio circadiano pode desempenhar um papel crítico na regulação dos mecanismos moleculares estabelecidos que mediam as respostas de força e crescimento muscular, através dos exercícios de resistência de força (CAMERA, 2018). Portanto, o exercício físico pode ser utilizado como uma estratégia terapêutica não farmacológica de controle, estabilização ou reajuste das vias de sinalização molecular que controla o ciclo sono-vigília no organismo (SCHRODER; ESSER, 2013).

## 2.8 - Avaliação dos biomarcadores metabólicos

Diversas modificações metabólicas são reconhecidas como ocorrências comuns, quando um sistema biológico se encontra em um estado de desregulação ou agravamento (WISHART, 2019). Como resultado, alterações metabólicas podem ser induzidas pela prática regular de exercícios físicos (CARO *et al.*, 2013; THYFAULT; BERGOUIGNAN, 2020). WAHREN *et al.* (1975) demonstraram que o status metabólico após 40-60 minutos de exercício físico contínuo em cicloergômetro, poderia ser comparado ao estado crônico de jejum/restrição calórica, vistos em alterações relacionadas à gliconeogênese, aumento do catabolismo de proteínas, elevada excreção de ureia e ao metabolismo de substâncias nitrogenada. No entanto, é bem estabelecido que a prática regular de exercícios físicos induz inúmeros efeitos

benéficos a curto e longo prazo no metabolismo, o que pode resultar em diversas adaptações fisiológicas vantajosas a longo prazo.

Nesse sentido, ao longo das últimas décadas, diversos biomarcadores metabólicos vêm sendo utilizados para descrever resultados do exercício físico e da privação do sono em humanos e modelos animais. Esses biomarcadores estão relacionados com diversas linhas de pesquisa em vias celulares para a produção de ATP,  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos livres, processos inflamatórios, estresse crônico, fadiga, estresse oxidativo e *overtraining* (HEANEY *et al.*, 2019; PALACIOS *et al.*, 2015).

No intuito de avaliar quali e quantitativamente esses processos, cresce a busca por biomarcadores específicos, com o intuito de investigar as ações e estímulos ambientais sobre vias metabólicas específicas, com consequentes produções de metabólitos compatíveis com o objetivo de cada estudo. Portanto, quando almejamos investigar as respostas fisiológicas e bioquímicas do exercício físico e da privação do sono, determinamos vias metabólicas específicas que podem atuar sob essa temática, e selecionamos alguns metabólitos ou analitos residuais que podem aparecer com maior frequência, estudando-os, dessa forma, de modo específico (CHOU *et al.*, 2020; DAVIES *et al.*, 2014; GISKEODEGARD *et al.*, 2015; HONMA *et al.*, 2020; MORVILLE *et al.*, 2020; OHMURA *et al.*, 2021).

Nessa perspectiva, estudos utilizando análises de metabolômica crescem exponencialmente na literatura científica (WISHART, 2019). A metabolômica é o estudo sistemático de todos os metabólitos, especificamente de pequenas moléculas, as quais possuem peso molecular inferior a 10 kDa, podendo ser hidratos de carbono, aminoácidos, nucleotídeos, lipídios e demais ácidos orgânicos, em amostras biológicas (KELLY *et al.*, 2020; NALBANTOGLU, 2019). Para examinar de forma abrangente o perfil dos metabólitos, essa abordagem analítica pode ser feita por duas formas distintas, a saber: a utilização de Espectrometria de Massa (MS); ou a utilização de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (KELLY *et al.*, 2020; NALBANTOGLU, 2019). Sendo assim, entende-se que a metabolômica desempenha um papel fundamental na caracterização de disparidades metabólicas entre e inter-indivíduos em resposta aos protocolos de exercício físico. Isso fornece um meio de caracterizar as diferenças metabólicas entre grupos e indivíduos, ao mesmo tempo em que contribui para o entendimento da biologia e dos mecanismos

biológicos subjacentes a essas diferenças (KELLY *et al.*, 2020; NALBANTOGLU, 2019).

O metaboloma é um reflexo dinâmico do genoma, transcriptoma, proteoma e de suas intrincadas interações com o ambiente, tornando-se uma ferramenta valiosa para estudar as experiências ao longo da vida de um indivíduo (CLISH, 2015; GONZALEZ-COVARRUBIAS *et al.*, 2022). Além disso, o metaboloma tem a capacidade de capturar exposições passadas, antecipar fenótipos futuros e fornecer informações sobre o estado atual e as respostas de um indivíduo. Assim, a metabolômica está idealmente posicionada para a exploração dos efeitos de diferentes protocolos de exercício físico sobre as respostas fisiológicas e bioquímicas de um organismo (WISHART, 2019).

A metabolômica incorpora o estudo dos metabólitos que são produzidos e liberados por meio de processos fisiológicos tanto no nível sistêmico quanto no celular, utilizando tecnologias metabolômicas não direcionadas capazes de analisar simultaneamente o grande número de metabólitos presentes em amostras biológicas, como plasma, urina e saliva (HEANEY *et al.*, 2019). Na mesma linha, (HONMA *et al.*, 2020) realizaram um experimento com o objetivo de investigar o efeito da privação aguda de sono em 12 jovens saudáveis e suas consequências nos resíduos metabólicos. Os resultados demonstraram que treonina, lisina e outros 13 níveis de metabólitos foram significativamente diferentes entre os períodos de sono e de privação de sono. O estudo de HU *et al.* (2021) teve a condução de um experimento com camundongos, estabelecendo com base em técnicas automatizadas de plataforma de movimento aleatório, aplicando uma estratégia de 10 dias consecutivos de 20 horas de privação de sono e 4 horas de repouso. Os resultados demonstraram a glutamina e outros dois metabólitos regulados negativamente, incluindo também outros 12 metabólitos regulados positivamente. LIANG *et al.* (2022) realizaram um estudo com 20 camundongos divididos em grupo controle e exercício físico, demonstrando que a acetilação da lisina induzida pelo exercício parece ser um contribuinte crucial para a alteração da energia livre de ligação às proteínas do músculo esquelético, sugerindo que a sua modulação é uma abordagem potencial para melhorar o desempenho no exercício físico.

CHOU *et al.* (2020) realizaram um experimento com o intuito de verificar a associação entre a duração e a qualidade do sono e o nível de ácido úrico de adultos

saudáveis. Os pesquisadores avaliaram 4,5 mil pacientes maiores de 18 anos e verificaram que a má qualidade do sono foi associada a níveis mais baixos de ácido úrico, enquanto a curta duração do sono foi associada a níveis mais elevados de ácido úrico. DUDZINSKA *et al.* (2015), por sua vez, realizaram um experimento com 60 indivíduos saudáveis, e demonstraram que um aumento máximo da concentração de uridina induzido pelo exercício físico está correlacionado com o aumento pós-exercício da concentração de ácido úrico. RASANEN *et al.* (1996) realizaram um experimento com 6 animais equinos *Standardbred* com o intuito de verificar o acúmulo de ácido úrico no plasma sanguíneo após uma sessão de *sprints* repetitivos. Os pesquisadores verificaram que a concentração plasmática de ácido úrico aumentou exponencialmente, indicando um rápido aumento na taxa de degradação de purinas, sendo assim, demonstraram que o exercício intenso provoca um aumento na capacidade antioxidante plasmática causado principalmente pelo aumento na concentração plasmática de ácido úrico.

Por último, a presente revisão de literatura tentou sumarizar os achados e elucidar as lacunas ainda presentes no meio acadêmico. Apesar de alguns trabalhos apontarem para a perda de desempenho após restrição de sono, a literatura carece de estudos que investiguem se essa perda específica da capacidade de força é acompanhada concomitantemente pela depleção dos estoques de glicogênio muscular, degradação de proteínas e produção de metabólitos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo, foi tentar esclarecer da melhor maneira possível, diferentes respostas autonômicas, hemodinâmicas e musculares em detrimento dos efeitos da restrição de sono e seus impactos sobre o desempenho de força de ratos submetidos a uma periodização de treinamento resistido com o controle e monitoramento das cargas de treinamento, mensurando a expressão proteica, o estoque energético de glicogênio muscular e a produção de metabólitos em resposta ao esforço físico.

### **3 - JUSTIFICATIVA**

A restrição de sono gera redução no desempenho esportivo, podendo levar os atletas a resultados inferiores que suas capacidades usuais. Os mecanismos bioquímicos e moleculares dessa redução têm sido investigados durante os últimos anos, todavia ainda são pouco conhecidos. Desta forma, entende-se a importância da utilização de modelos animais para o estudo sobre este tema recorrente no cotidiano dos atletas, podendo contribuir com resultados e dados que viabilizem melhores condições de rendimento nas respectivas modalidades esportivas.

## **4 - OBJETIVOS**

### 4.1 - Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho será investigar o efeito da restrição de sono em uma sessão aguda de exercício físico resistido em ratos treinados.

### 4.2 - Objetivos Específicos

Mensurar o aumento da capacidade de força máxima através de um protocolo de treinamento

Avaliar a influência de um protocolo de seis horas de restrição de sono no teste de força máxima voluntária dos ratos Wistar.

Mensurar o glicogênio muscular dos ratos Wistar após o protocolo de restrição de sono e teste de força máxima.

Quantificar alterações metabólicas (não alvo) em resposta aos protocolos de exercício físico e restrição de sono nos ratos Wistar.

## **5 - HIPÓTESE**

O protocolo de seis horas de restrição de sono reduzirá o desempenho no teste de força máxima voluntária nos animais submetidos ao protocolo em relação aos animais que não serão submetidos. Esta redução de desempenho nos grupos experimentais restritos de sono ocorrerá devido a alterações metabólicas.

## 6 - MATERIAL E MÉTODOS

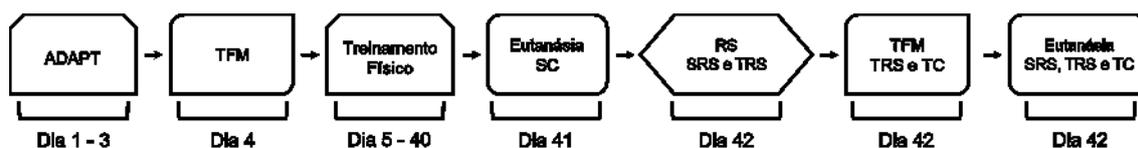
### 6.1 - Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos com 60 dias de idade obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais Para Biologia e Medicina (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo. Todos os procedimentos estão de acordo com o Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (8a. Edição, National Academic Press) e foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Paulo, protocolado sob o número 8196230418. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Sedentário Controle (SC; N = 5), Sedentário Restrição de Sono (SRS; N = 5), Treinado Controle (TC; N = 10), e Treinado Restrição de Sono (TRS; N = 10). Foram alocados cinco animais por caixa, com espaço de 49 x 34 x 16 cm e 5331 cm<sup>3</sup>/rato (SCARIOT *et al.*, 2015).

Durante o período de estudo, os animais foram mantidos em salas com temperatura controlada (entre 20°C e 22°C), umidade relativa do ar entre 55 e 65%, com ciclo claro-escuro constante (12/12h) com início do período claro às 07h, com livre acesso à água e a ração AIN-93 descrita por (REEVES, 1997).

### 6.2 - Desenho experimental

Após a chegada no biotério, os animais permaneceram por 30 dias em aclimatização. Após esse período, os animais passaram por um período de três dias de adaptação ao exercício resistido e familiarização com o ergômetro de escalada. No quarto dia os animais foram submetidos ao teste de força máxima (TFM). A partir do quinto dia, os animais dos grupos TC e TRS iniciaram o protocolo de treinamento de força com duração de seis semanas. No dia seguinte à última sessão de treinamento, os animais dos grupos TRS e SRS foram submetidos a um período de seis horas de restrição de sono. Ao final da restrição de sono, os animais dos grupos treinados (TC e TRS) foram submetidos novamente ao TFM e imediatamente após, eutanasiados junto aos animais dos grupos sedentários (SC e SRS). Imediatamente após a eutanásia, foram extraídas amostras dos músculos sóleo e plantar para análise molecular e das concentrações de glicogênio muscular. Foram extraídas amostras do sangue para extração do soro para análises de metabolômica (Figura 2).



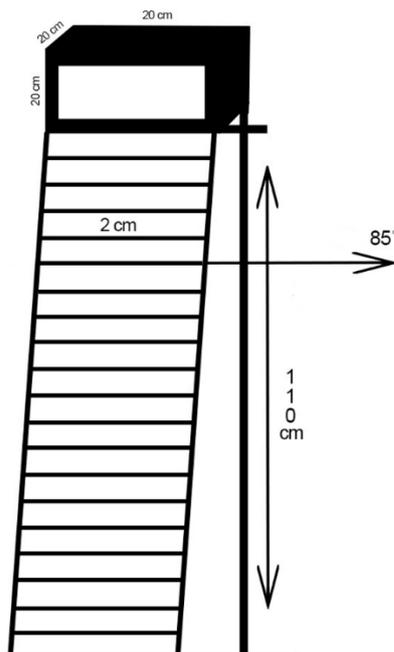
**Figura 2.** Desenho experimental e procedimentos realizados cronologicamente ao longo de seis semanas. ADAPT = Adaptação ao Exercício Físico; TFM = Teste de Força Máxima; RS = Restrição de Sono; Grupos: SC = Sedentário Controle; SRS = Sedentário Restrição de Sono; TRS = Treinado Restrição de Sono; TC = Treinado Controle.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados durante o período noturno (a partir das 19h00) em função do período de vigília dos animais e sua maior predisposição para a realização de esforços físicos (BECK *et al.*, 2014). Posicionou-se o aparato de luz no alto da sala de experimentos, garantindo luminosidade igual para todos os animais. Utilizou-se uma lâmpada de 100 W (Phillips® soft white light, 2700 K, 565–590 nm) com um filtro vermelho (ROSCO®, mod.#FIRE19) bloqueando a energia espectral abaixo de 600nm, sendo a intensidade de luz individual máxima de 15 lux (BECK; GOBATTO, 2013).

### 6.3 - Adaptação ao exercício físico

Os animais dos grupos TC e TRS realizaram três sessões de adaptação ao exercício físico (ADAPT) sem sobrecarga externa, conduzidas ao longo dos três dias iniciais, sendo realizada uma sessão de adaptação por dia. Em cada sessão, os animais foram colocados na escada de treinamento e estimulados a subir até o ponto mais elevado, podendo então descansar no topo por 120 segundos até iniciar uma nova subida, realizando três subidas ao todo por sessão. Para realizar a escalada do início ao final da escada, os animais precisaram realizar seis movimentos de escalada com cada pata (HORNBERGER; FARRAR, 2004).

A escada de treinamento possuía as medidas: 110cm de altura com 85° de inclinação, seus degraus têm 2 cm de intervalo e são compostos por parafusos para que haja mais atrito e aderência com as patas do animal. No topo da escada, o ergômetro apresenta um espaço de 20x20x20 cm para que o animal descanse entre as escaladas (Figura 2). Todas as sessões de treinamento tiveram início às 19h00 horas.



**Figura 3.** Ergômetro de escalada utilizado durante o Teste de Força Máxima (TFM) e sessões de treino, e detalhamento de suas respectivas medidas.

#### 6.4 - Teste de força máxima (TFM)

O TFM foi realizado de acordo com o protocolo previamente descrito por (HORNBERGER; FARRAR, 2004). O teste foi caracterizado por um protocolo de cargas progressivas. Para tal, cada animal executou ao menos quatro escaladas, sendo estas realizadas respectivamente com as cargas de 50, 75, 90 e 100% da massa corporal (%mc). A partir da quinta escalada, foi acrescido 25% mc na carga em cada subida. O final do teste foi determinado quando o animal não obteve êxito em completar uma escalada. Os intervalos entre as escaladas foram de 120 segundos. A maior carga em que o animal conseguiu completar a escalada, foi somada à sua massa corporal para quantificar a carga de força máxima individual.

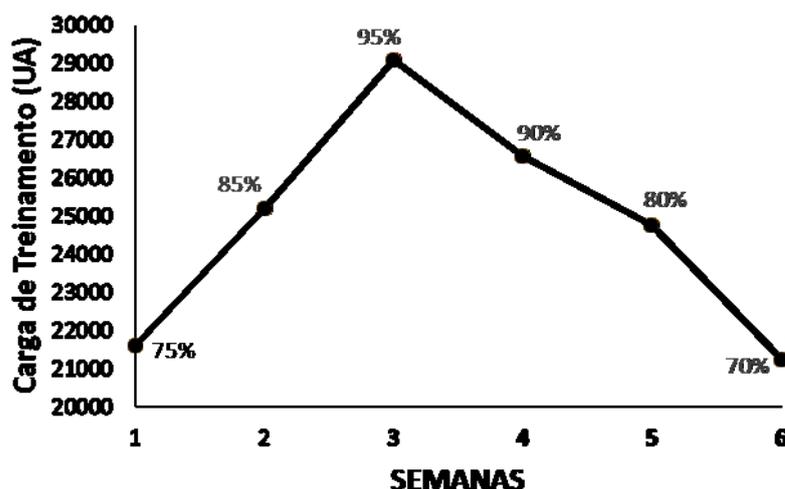
As cargas dos animais foram compostas por tubos do tipo *Falcon* de 50 ml preenchidos com pesos de chumbo. Os tubos foram atados às caudas dos animais por meio de fita adesiva. A sobrecarga individual dos animais foi considerada como a soma dos pesos dos tubos e dos chumbos neles contidos.

Os animais foram estimulados com um suave toque na cauda, se necessário, para continuar o movimento de subida. Por medidas de segurança, durante o procedimento de escalada, o pesquisador manteve as mãos próximas dos animais,

sem tocá-los até chegar ao topo da escada, evitando assim possíveis quedas por exaustão.

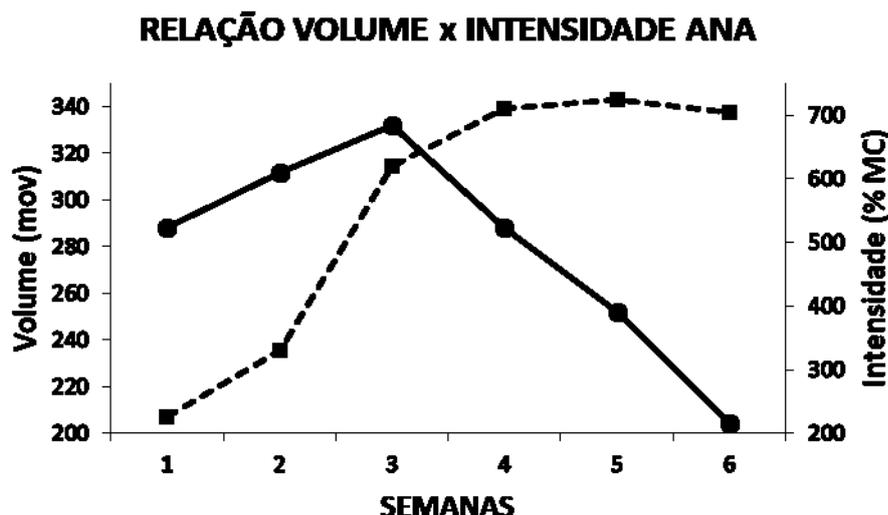
### 6.5 - Periodização

Foi utilizado como base o modelo clássico de periodização linear descrito por (MATVÉIEV, 1986). O macrociclo teve duração de seis semanas, totalizando 30 sessões de exercícios físicos. Foi composto por dois mesociclos com três semanas de duração cada. Ambos os mesociclos tiveram caráter de desenvolvimento (MONTEIRO; LOPES, 2009; ZAKHAROV, 2003). Conforme mostrado na Figura 4, os microciclos foram realizados sob seis cargas de treinamento diferentes: 75, 85, 95, 90, 80 e 70% da carga máxima semanal (30.000 UA) (MONTEIRO; LOPES, 2009; ZAKHAROV, 2003).



**Figura 4.** Representação carga (produto entre volume [movimentos] e intensidade [%mc]) de treinamento dos microciclos. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA) e em percentuais relativos à carga máxima pré-estabelecida (30000 UA).

Neste modelo, a estrutura do treinamento tem como característica um volume elevado imposto no início do processo de treinamento com posterior redução. De forma inversamente proporcional, a intensidade inicia de forma reduzida com posterior aumento (Figura 5). Assim, a elevada carga inicial se dá por conta do maior volume do que pela intensidade. Enquanto a carga final se dá predominantemente por conta da intensidade e não pelo volume.



**Figura 5.** Modelo de periodização linear aplicado ao longo das seis semanas de treinamento.  
 ●: Volume realizado; ■: Intensidade realizada.

O volume semanal de treino foi calculado a partir da somatória total de movimentos realizados em cada escalada durante as sessões de treino. A intensidade semanal foi calculada a partir da somatória da intensidade (%mc) das sessões de treino semanais. A carga máxima de esforço da semanal (produto entre volume e intensidade) foi estipulada em 30.000 unidades arbitrárias (UA), e estimada através da fórmula:  $\Sigma \text{carga} = (\text{volume} \times \text{intensidade de treino segunda feira}) + (\text{volume} \times \text{intensidade de treino terça feira}) + \dots (\text{volume} \times \text{intensidade de treino domingo})$  (FOSTER, 1998; FOSTER *et al.*, 1996).

Abaixo, na tabela 1, podemos ver a organização das sessões de treino, que foram precedidas por um aquecimento muscular localizado composto por duas escaladas sem sobrecarga adicional. Cada sessão de treino foi realizada de acordo com uma das quatro seguintes relações de volume, intensidade e densidade:

Metabólico 1 (MET 1 = 8 x 12 movimentos com 75%mc com 60seg de intervalo).

Metabólico 2 (MET 2 = 6 x 10 movimentos com 90%mc com 75seg de intervalo).

Metabólico 3 (MET 3 = 4 x 8 movimentos com 100%mc com 90seg de intervalo).

Tensional (TENS = 4 x 4 movimentos com 180%mc com 120seg de intervalo).

**Tabela 1.** Organização das sessões de treino ao longo de seis semanas.

<b>DIA</b>	<b>SEMANA 1</b>	<b>SEMANA 2</b>	<b>SEMANA 3</b>	<b>SEMANA 4</b>	<b>SEMANA 5</b>	<b>SEMANA 6</b>
<b>SEG</b>	ADAPT	-	MET 1	TENS	TENS	TENS
<b>TER</b>	ADAPT	MET 1	MET 3	MET 3	MET 3	MET 1
<b>QUA</b>	ADAPT	MET 2	MET 2	MET 1	MET 1	TENS
<b>QUI</b>	TFM	-	TENS	TENS	MET 2	MET 2
<b>SEX</b>	MET 1	MET 1	MET 1	MET 3	MET 3	TENS
<b>SÁB</b>	MET 1	MET 2	MET 3	MET 1	TENS	RS
<b>DOM</b>	MET 1	-	-	-	-	TFM

Adaptação ao Exercício Físico (ADAPT = 3x12, sem sobrecarga, 120seg de intervalo); Metabólico 1 (MET 1 = 8x12 movimentos, 75%mc, 60seg de intervalo); Metabólico 2 (MET 2 = 6x10 movimentos, 90%mc, 75seg de intervalo); Metabólico 3 (MET 3 = 4x8 movimentos, 100%mc, 90seg de intervalo); Tensional (TENS = 4x4 movimentos, 180%mc, 120seg de intervalo); TFM (Teste de Força Máxima); RS (Restrição de Sono).

### 6.6 - Restrição de sono

Para restringir o sono dos animais foi utilizado o protocolo adaptado de (FRANKEN *et al.*, 1993). Durante as seis horas de restrição do sono, os animais permaneceram em suas respectivas caixas sendo observados a todo momento pelo pesquisador. Quando os animais assumiam uma posição de sono, eles eram ativados por estímulos acústicos e, se necessário, por estímulos táteis. Água e ração foram disponibilizados ad libitum durante todo o procedimento.

### 6.7 - Eutanásia

Os grupos SC e SR foram eutanasiados em repouso e os grupos TC e TRS, imediatamente após o TFM. Todos os animais foram eutanasiados por decapitação, após anestesia geral com 30 à 40mg/kg (intraperitoneal) de pentobarbital. Um toque na córnea e um aperto na pata dos animais foram utilizados para confirmar o adequado nível de anestesia.

### 6.8 - Extração de tecidos

Imediatamente após a eutanásia, os músculos sóleo e plantar foram extraídos, e imersos em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em ambiente  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 6.9 - Glicogênio muscular

A concentração de glicogênio muscular foi determinada por método colorimétrico usando o *Glycogen Assay Kit*, SIGMA-ALDRICH® seguindo as instruções do fabricante. Para tal, 10mg de tecido foram homogeneizados com 100uL de água destilada. O homogenato foi fervido por 5 minutos e centrifugado à  $13.000 \times \text{RCF}$  por 5 minutos para remoção de materiais insolúveis. As amostras foram misturadas com tampão (fornecido pelo fabricante) até completar o volume final de 50uL. A absorvância das amostras foram analisadas à 570nm e as concentrações de glicogênio foram determinadas a partir de uma regressão linear obtida pela curva dos padrões.

### 6.10 - Extração do soro

A amostra sanguínea coletada dos animais foi centrifugada a 1.500 rpm durante 15 min em centrífuga refrigerada ( $2 - 8^{\circ}$ ), e o soro retirado foi armazenado em alíquotas de 200 a 500 $\mu\text{L}$ , alocados dentro de freezer a  $-80^{\circ}$  para posterior determinação da análise metabolômica.

### 6.11 - Análise metabolômica

Análise em modo Scan por GCMS. Para a análise em GC-MS, 50uL de cada amostra de plasma de rato foram misturados em um vortex com 150uL de metanol gelado na proporção 3:1 (metanol:amostra) para garantir deproteinização total, e então centrifugada por 13 min a 10000 rpm a temperatura ambiente. 100uL do sobrenadante foram transferidos para vials de análise em GC-MS contendo inserts de vidro, e então evaporados em SpeedVac a  $30^{\circ}\text{C}$ . Para a metoximação das amostras, 15uL de hidrócloro de O-metoxiamina (15mg/mL) em piridina foram adicionados a cada vial de análise e então levados ao vortex e a um ultrassom num ciclo de 3 vezes cada. Os vials foram cobertos e incubados em ambiente escuro e em temperatura ambiente por 16 horas. Após a incubação, 15uL de BSTFA com 1% de TMCS (v/v) foram adicionados, e as amostras vortexadas e incubadas a  $70^{\circ}\text{C}$  por 1h para o

processo de silição. No final do procedimento, de 20ppm do padrão interno ácido pentadecanóico (diluído em heptano) foram adicionados a cada vial de análise. Três amostras de branco e duas de controle de qualidade feitos a partir de um pool das amostras foram preparados seguindo o mesmo procedimento das amostras preparadas e foram analisados no início, meio e final da sequência (KIND *et al.*, 2009).

A análise das amostras foi conduzida num sistema de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (GCMS-QP2020 NX) proveniente da Shimadzu Co. (Kyoto, Japan).

Para a separação, 1 $\mu$ L da amostra foi carregado numa coluna DB5-MS (30m x 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m, Restek). A amostra foi injetada em modo splitless num fluxo de 20 mL/min de gás Hélio, e o gás carregador conduzido num fluxo constante de 1,36 ml/min. A temperatura inicial da coluna foi inicialmente mantida a 80o e então aumentada gradativamente numa taxa de 15oC/min até atingir a temperatura final de 300oC e mantida nesta mesma temperatura por 8 min antes de resfriá-la. As temperaturas do injetor, linha de transferência e filamento da fonte e o quadrupolo foram mantidas a 280, 200, 150 e 150oC, respectivamente. O sistema operou em modo de full scan (m/z 40-650) numa taxa de 3 espectros/s, e com o EI configurado a 70eV. Então um método de tempo de retenção fechado (TRF) foi aplicado para reduzir o tempo de retenção (TR) de toda a análise (MASTRANGELO *et al.*, 2015).

O controle dos instrumentos, a aquisição de dados e o processamento de dados foram realizados pelo software LabSolutions (GCMS versão 4.5), Shimadzu Co., Japão), que permite um controle em tempo real de cada analito analisado para a identificação dos metabólitos em modo SIM e Scan.

Identificação e quantificação de moléculas. Para as análises em modo Scan, os metabólitos detectados foram processados para a criação de uma matriz unificada de variáveis a partir dos diferentes estados de carga, adutos e grupos dos mesmos analitos através todas as amostras, e para isso foram utilizados os softwares GCMS Solution (v.3.30), NIST 17 MASS (v.1.00.1) e GCMS Smart Metabolite (v.3.01), todos desenvolvidos pela Shimadzu Co. Os softwares foram configurados da maneira mais eficiente possível para processar todos os picos detectados, separando-os do ruído do equipamento. Após a identificação das moléculas identificadas pelas bibliotecas NIST [14] e Smart Metabolite, as amostras foram exportadas para o software Excel (Microsoft Office) para tratamento estatístico. Bases de dados públicas disponíveis na

internet (<https://www.genome.jp/kegg/> e <http://www.hmdb.ca>) fora, utilizadas para a identificação e/ou conformação de espectros de GC-MS.

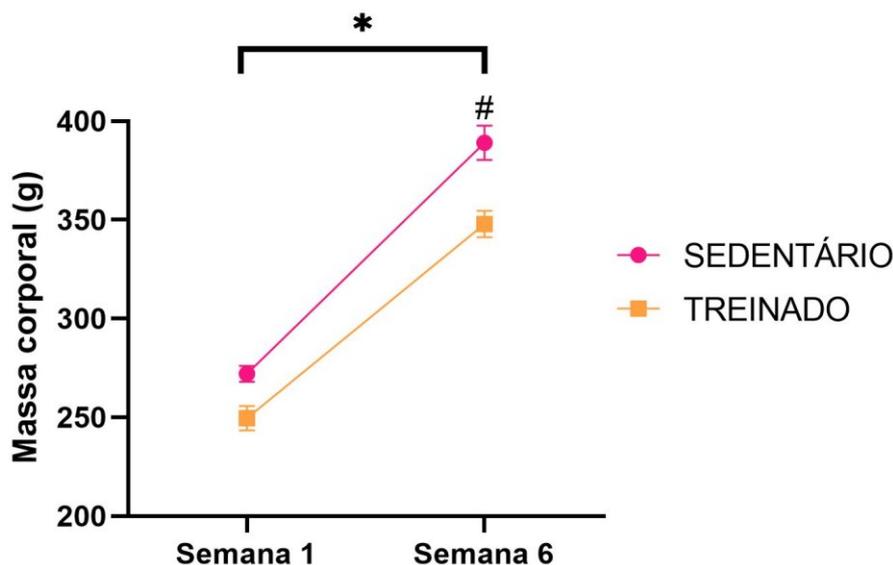
#### 6.12 - Análise estatística

Todos os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Foi utilizado a análise de variância (ANOVA) *one-way* seguida do teste post hoc de *Tukey* para as comparações de médias de massa corporal, força máxima e glicogênio muscular. Foi considerado um  $P < 0,05$  capaz de revelar diferenças estatísticas. Os dados foram analisados com o programa GraphPad Prism® 8.4.3.

## 7 - RESULTADOS

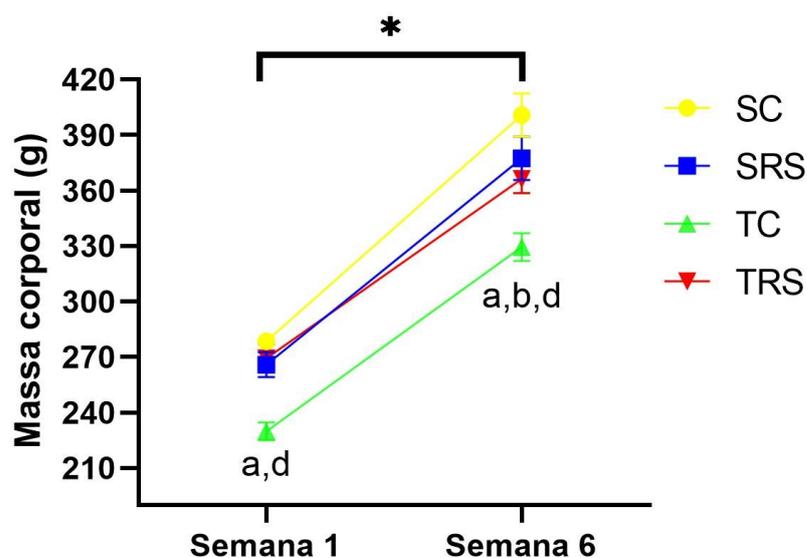
### 7.1 - Massa corporal

A Figura 6 demonstra os valores de massa corporal para os animais divididos em apenas dois grandes grupos (sedentário e treinado), na primeira semana e ao final da sexta semana de treinamento. Os dois grupos aumentaram significativamente a massa corporal ao longo do experimento ( $P < 0,0001$ ;  $F = 81,58$ ).



**Figura 6.** Valores de massa corporal observados antes e após o treinamento de seis semanas para os grupos Sedentário e Treinado. \*: diferença significativa para todos os grupos entre a semana 1 e 6 ( $P < 0,05$ ). #: diferença significativa entre grupo treinado vs sedentário ao final da semana 6 ( $P < 0,05$ ).

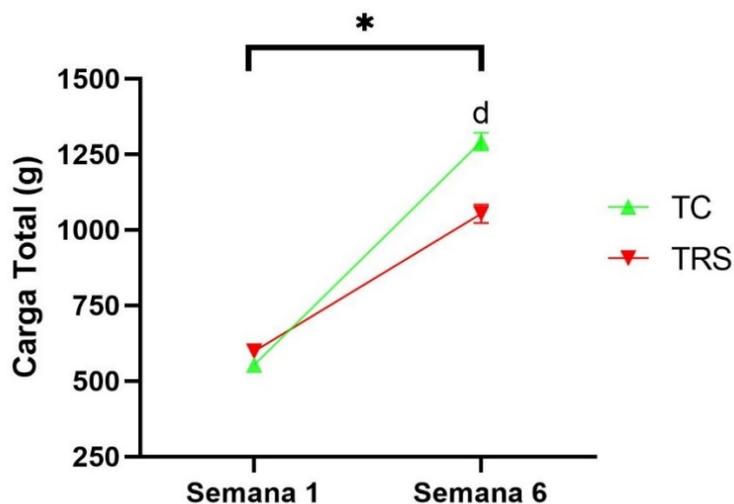
A Figura 7 demonstra os valores de massa corporal para os grupos de forma detalhada (SC, SRS, TC, TRS), na primeira semana e ao final da sexta semana de treinamento. Os grupos aumentaram significativamente a massa corporal ao longo do experimento ( $P < 0,0001$ ;  $F = 58,95$ ). Antes do treinamento, o grupo TC apresentou massa corporal significativamente inferior em relação aos grupos SC ( $P = 0,0035$ ) e TRS ( $P = 0,0039$ ). Após o treinamento, o grupo TC apresentou massa corporal significativamente inferior em relação aos grupos SC ( $P < 0,0001$ ), SRS ( $P = 0,0044$ ) e TRS ( $P = 0,0089$ ).



**Figura 7.** Valores de massa corporal observados antes e após o treinamento de seis semanas para os grupos Sedentário Controle (SC), Sedentário Restrição de Sono (SRS), Treinado Controle (TC) e Treinamento Restrição de Sono (TRS). \*: diferença significativa para todos os grupos entre as semanas ( $P < 0,05$ ). a: diferença significativa em relação ao grupo SC ( $P < 0,05$ ); b: diferença significativa em relação ao grupo SRS ( $P < 0,05$ ); d: diferença significativa em relação ao grupo TRS ( $P < 0,05$ ).

## 7.2 - Teste de força máxima

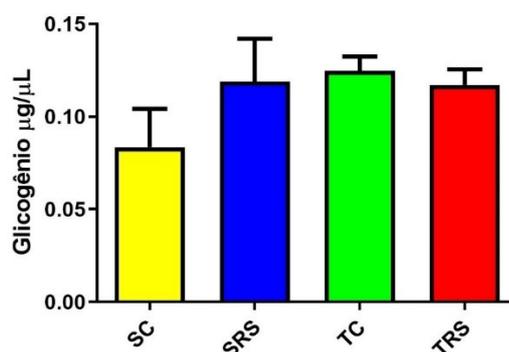
Os valores de força máxima observados para os grupos TC e TRS não foram diferentes significativamente antes do período de treinamento ( $P = 0,606$ ). Após o período de treinamento, houve aumento significativo da força dos animais treinados de ambos os grupos ( $P < 0,0001$ ;  $F = 198,9$ ). Entretanto o grupo TC, demonstrou valores superiores após o treinamento em relação ao grupo TRS ( $P < 0,0001$ ). A Figura 8 demonstra os resultados do TFM.



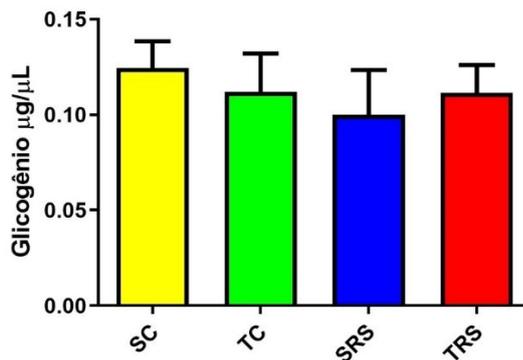
**Figura 8.** Valores de Força Máxima (soma da carga máxima executada e massa corporal do animal) observados antes e após o período de treinamento de seis semanas nos grupos Treinado Controle (TC) e Treinado Restrição de Sono (TRS). \*: diferença significativa para todos os grupos entre as semanas ( $P < 0,05$ ); d: diferença significativa em relação ao grupo TRS ( $P < 0,05$ ).

### 7.3 - Glicogênio muscular

Nas Figuras 9 e 10 estão demonstrados os resultados da análise do glicogênio muscular referente respectivamente aos músculos plantar e sóleo para os quatro grupos. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas concentrações de glicogênio dos músculos plantar ( $P = 0,1963$ ;  $F = 1,682$ ) e sóleo ( $P = 0,9072$ ;  $F = 0,1827$ ) entre os diferentes grupos experimentais.



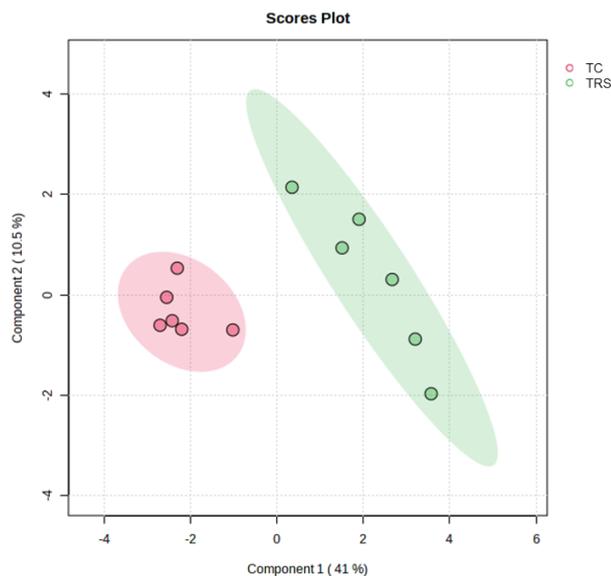
**Figura 9.** Concentração de glicogênio do músculo plantar (expressa em ug/ul) após seis semanas de treinamento para os grupos Sedentário Controle (SC), Sedentário Restrição de Sono (SRS), Treinado Controle (TC) e Treinamento Restrição de Sono (TRS).



**Figura 10.** Concentração de glicogênio do músculo sóleo (expressa em ug/ul) após seis semanas de treinamento para os grupos Sedentário Controle (SC), Sedentário Restrição de Sono (SRS), Treinado Controle (TC) e Treinamento Restrição de Sono (TRS).

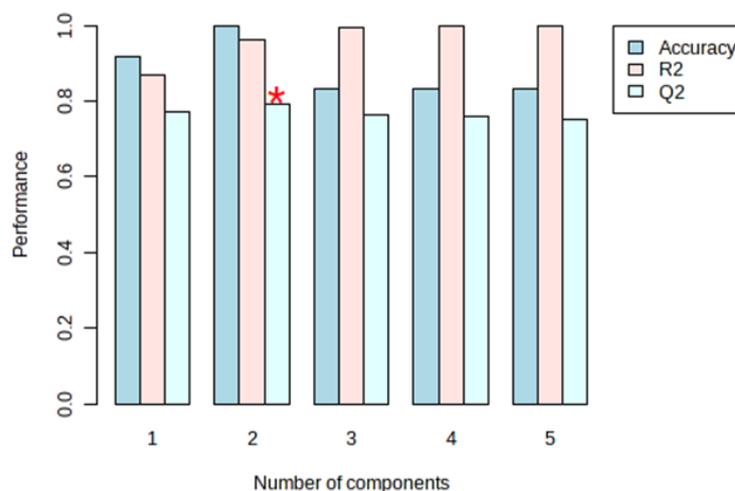
#### 7.4 - Análise metabolômica

A Figura 11 demonstra todos os animais (cada um dos pontos no gráfico correspondente a um animal do grupo) em dois grandes *clusters* (*cluster* é um aglomerado de animais, que demonstra a área de classificação da amostra de forma agrupada), formando assim um modelo de classificação (*score plot*) para os animais divididos dentro dos grupos TC e TRS respectivamente. A análise é baseada nos dois componentes principais (eixo x e eixo y) dos dados obtidos ao longo da análise, demonstrando associação entre os metabólitos analisados em relação aos grupos analisados. A imagem mostra a separação natural entre os grupos de animais, ou seja, o componente 1 é responsável por 41% da variação dos dados no eixo x em relação a amostra, e o componente 2 responsável por 10,5% da variação dos dados no eixo y em relação a amostra.



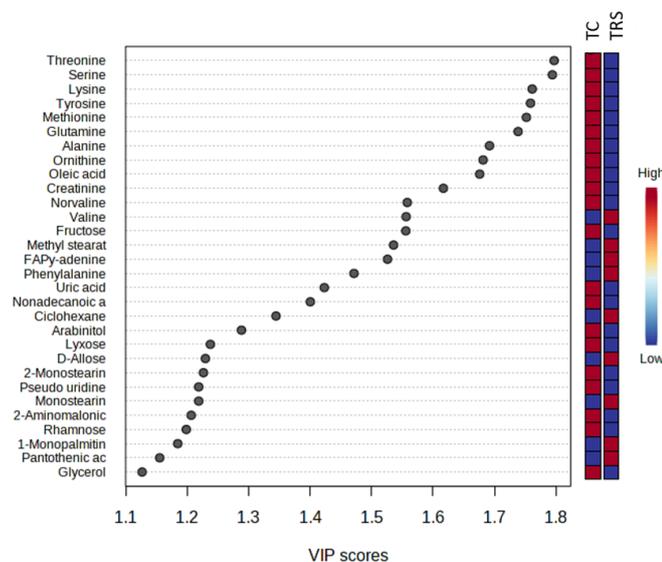
**Figura 11.** *Scores Plot* para os grupos Treinado Controle (TC) e Treinamento Restrição de Sono (TRS). A análise é baseada nos dois componentes principais (eixo x e eixo y) dos dados obtidos ao longo da análise, demonstrando associação entre os metabólitos analisados em relação aos grupos analisados. A imagem mostra a separação natural entre os grupos de animais, ou seja, o componente 1 é responsável por 41% da variação dos dados no eixo x em relação a amostra, e o componente dois responsável por 10,5% da variação dos dados no eixo y em relação a amostra. Cada um dos pontos no gráfico corresponde a um animal do grupo.

A Figura 12 demonstra os *Variable Importance in Projection (VIP) score* e validação cruzada (VC) do modelo, demonstrando o resultado da análise multivariada na segunda componente do Q2. Os resultados da análise de validação cruzada apontaram boa eficácia e precisão do modelo do estudo. Nesta figura demonstra-se o valor de *performance* de 0.78, podendo ser avaliada como boa classificação (acima de 0,75) para a capacidade preditiva do modelo de classificação (*score plot*) demonstrado na imagem anterior. O valor de *performance* acima de 0,9 de acurácia e R2 demonstra que os valores de sensibilidade e especificidade são altos (baixas possibilidades de falsos positivos ou negativos), demonstrando boa capacidade preditiva do modelo de classificação.



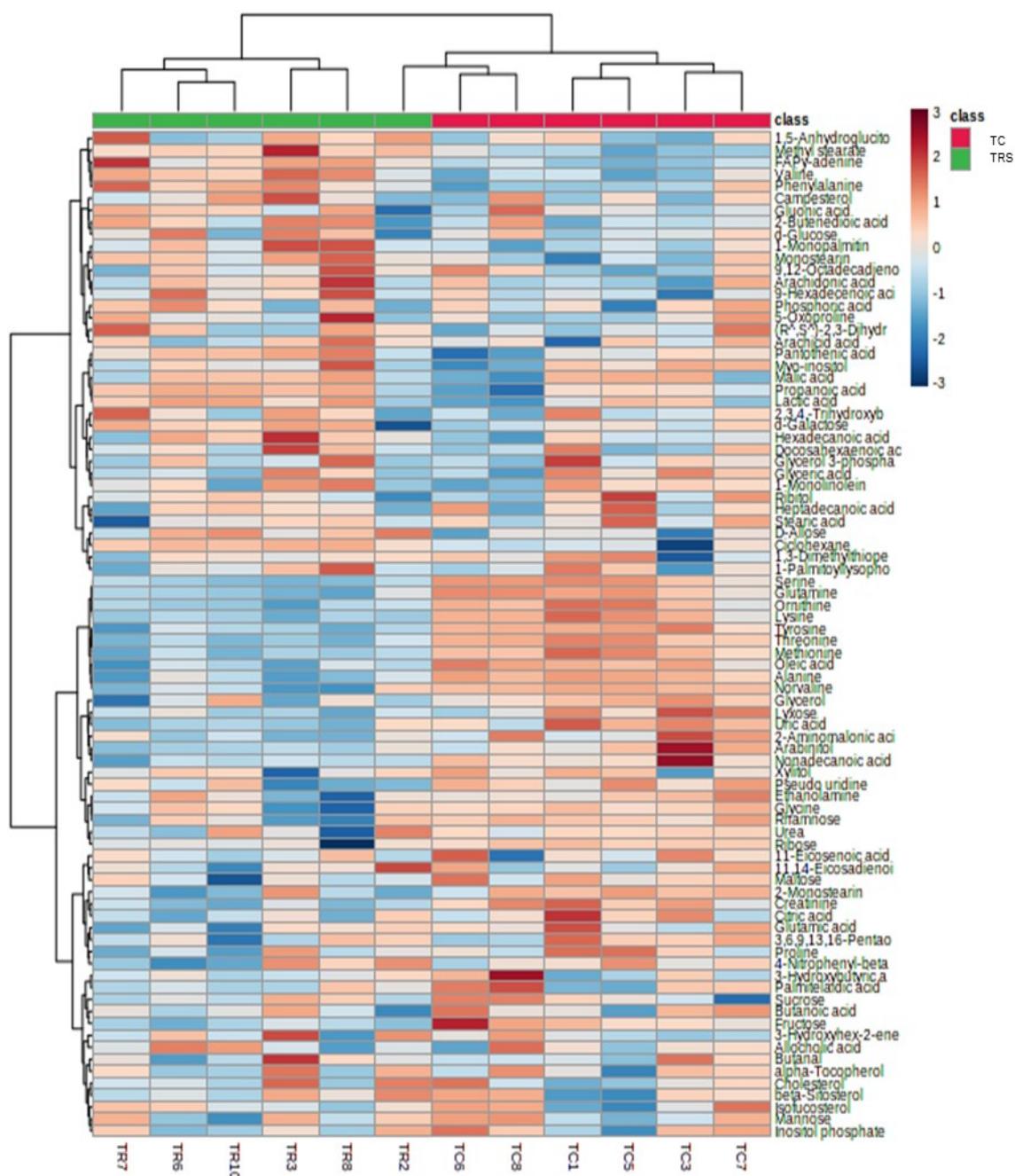
**Figura 12.** Q2 é uma estimativa da capacidade preditiva do modelo e é calculada por meio de validação cruzada (VC). Em cada VC, os dados previstos são comparados com os dados originais e a soma dos erros quadrados é calculada. Os resultados da análise de validação cruzada apontaram boa eficácia para os valores de *performance* (acima de 0,75 para Q2 e acima de 0,8 para acurácia e R2) e precisão do modelo de classificação do estudo. O asterisco vermelho indica o melhor classificador para Q2 na segunda componente.

A Figura 13 mostra o gráfico *Orthogonal Principal List Score* (OPLS) – *VIP Score* e validação cruzada do modelo, demonstrando os valores dos 30 metabólitos mais relevantes (sequenciados dos maiores para os menores) para separação dos grupos em relação à imagem 13 (*score plots*). Atribui-se relevância para cada um dos metabólitos em cada um dos animais nos dois grupos (TC e TRS), separando-os em dois grandes clusters. Analisando, portanto, as variáveis ortogonais dos quadrados parciais tratados com escalonamento em “paretos” não causando variações numéricas. Ou seja, quanto maior o *VIP Score* (eixo x) de um analito, maior a importância ele exerce na distinção e classificação dos grupos TC e TRS. Utiliza-se os analitos que encontram *VIP Score* acima de 1.0 como boa classificação para o modelo. O código de cores indica baixo pico de intensidade em azul, e alto pico de intensidade em vermelho para cada um dos analitos em relação ao respectivo grupo.



**Figura 13.** OPLS – VIP Score e validação cruzada do modelo de classificação. A imagem demonstra os valores dos 30 metabólitos mais relevantes sequenciados dos maiores para os menores. Quanto maior o VIP Score (eixo x) de um analito, maior a importância que exerce na distinção e classificação dos grupos TC e TRS. O código de cores indica baixo pico de intensidade em azul, e alto pico de intensidade em vermelho para cada um dos analitos em relação ao respectivo grupo.

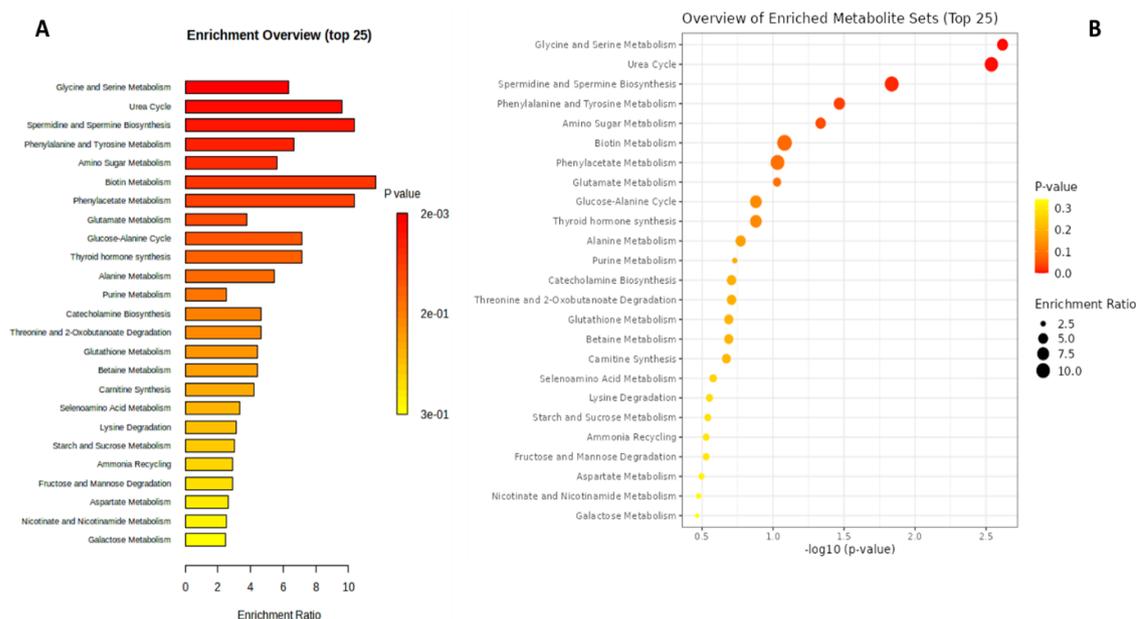
A figura 14 demonstra o mapa de calor para cada um dos metabólitos, em cada um dos animais, divididos nos grupos TC (rosa) e TRS (verde). Na análise de *cluster* hierárquica (aglomerativa), cada amostra começa como um cluster separado e o algoritmo prossegue combinando-os até que todas as amostras pertençam a um *cluster*. Os conjuntos de colunas (acima) e linhas (à esquerda) demonstram possíveis correlações entre animais, grupos e metabólitos. O código de cores indica baixo pico de intensidade em azul, e alto pico de intensidade em vermelho para cada um dos analitos em relação ao respectivo animal e grupo. Nota-se o *cluster* para a sequência de metabólitos: serina, glutamina, ornitina, lisina, tirosina, treonina, metionina, ácido oleico, alanina, norvalina, glicerol, lixose e ácido úrico.



**Figura 14.** Mapa de calor para cada um dos metabólitos, em cada um dos animais, divididos nos grupos TC (rosa) e TRS (verde). Os conjuntos de colunas (acima) e linhas (a esquerda) demonstram possíveis correlações entre animais, grupos e metabólitos. O código de cores nos quadrantes indica baixo pico de intensidade em azul, e alto pico de intensidade em vermelho para cada um dos analitos em relação ao respectivo animal e grupo. Nota-se o *cluster* para a sequência de metabólitos: serina, glutamina, ornitina, lisina, tirosina, treonina, metionina, ácido oleico, alanina, norvalina, glicerol, lixose e ácido úrico.

A Figura 15 demonstra a análise de enriquecimento das 25 vias metabólicas mais significativas. Ambas as imagens (A e B) representam os mesmos resultados,

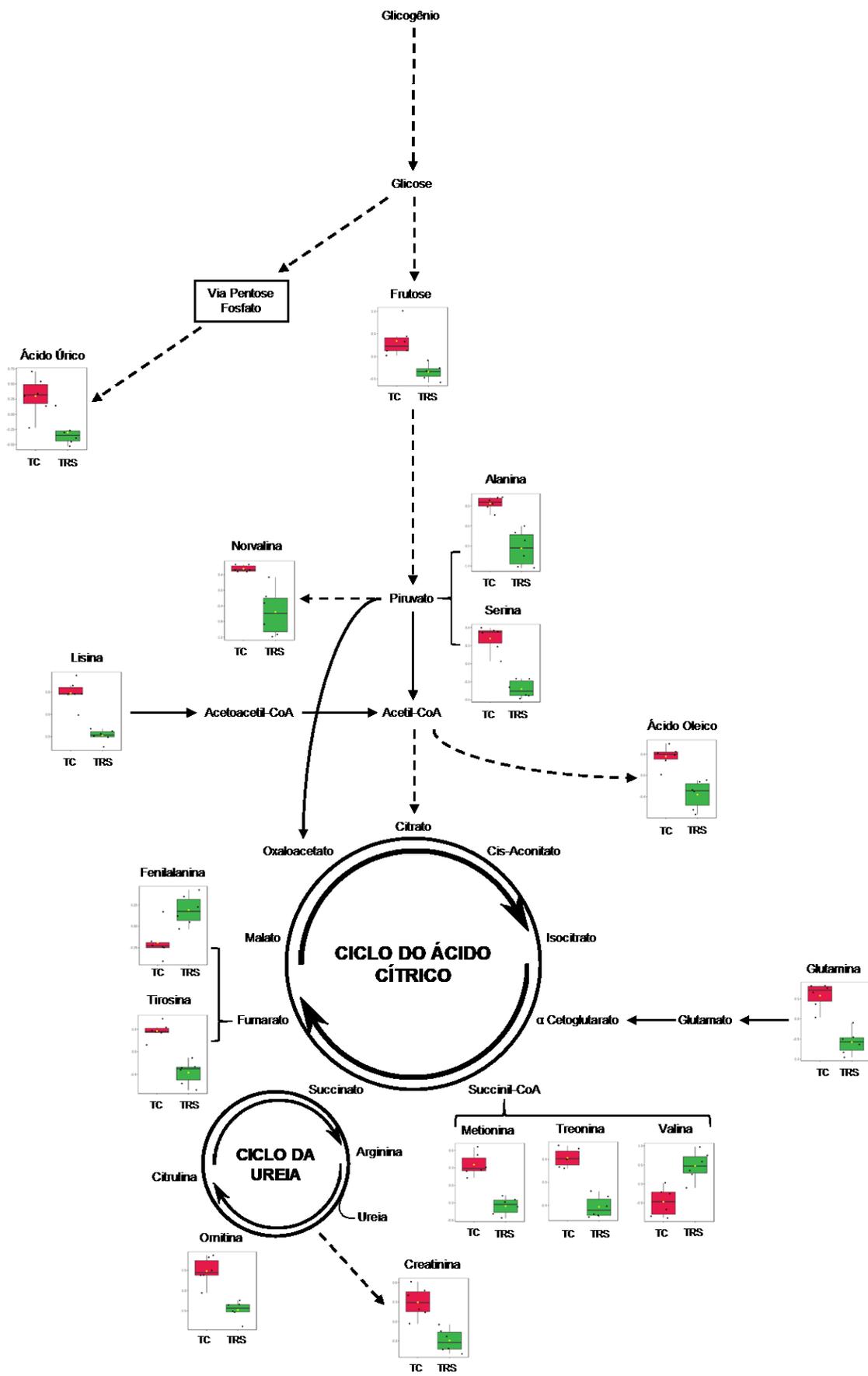
apenas demonstradas de formas distintas para melhor compreensão e interpretação do leitor. Na imagem A, cada barra demonstra o índice de enriquecimento. Quanto maior a barra, mais representativa é a via metabólica no experimento conduzido. O mesmo acontece para a imagem B, cada ponto demonstra o índice de enriquecimento. Quanto maior o ponto, mais representativa é a via metabólica no experimento conduzido. A coloração para cada uma das vias metabólicas representa o valor de P, tanto para as barras (A) quanto para os pontos (B).



**Figura 15.** Análise de enriquecimento das 25 principais vias metabólicas. Na imagem A, cada barra demonstra o índice de enriquecimento. Quanto maior a barra, mais representativa é a via metabólica no experimento conduzido. O mesmo acontece para a imagem B, cada ponto demonstra o índice de enriquecimento. Quanto maior o ponto, mais representativa é a via metabólica no experimento conduzido. A coloração para cada uma das vias metabólicas representa o valor de P, tanto para as barras (A) quanto para os pontos (B).

A Figura 16 demonstra os resultados dos analitos divididos nos respectivos grupos TC e TRS, aplicados e inseridos dentro da via de glicose anaeróbia, ciclo do ácido cítrico e ciclo da ureia. Podemos notar que os metabólitos ácido úrico ( $P = 0,004$ ;  $F = 0,023$ ), frutose ( $P = 0,001$ ;  $F = 0,010$ ), alanina ( $P = 0,0001$ ;  $F = 0,001$ ), norvalina ( $P = 0,001$ ;  $F = 0,009$ ), serina ( $P = 0,00001$ ;  $F = 0,0005$ ), lisina ( $P = 0,00003$ ;  $F = 0,0006$ ), ácido oleico ( $P = 0,0003$ ;  $F = 0,003$ ), glutamina ( $P = 0,0007$ ;  $F = 0,001$ ), tirosina ( $P = 0,0003$ ;  $F = 0,006$ ), metionina ( $P = 0,0003$ ;  $F = 0,006$ ), treonina ( $P = 0,000007$ ;  $F = 0,0005$ ), ornitina ( $P = 0,0001$ ;  $F = 0,001$ ) e creatinina ( $P = 0,007$ ;  $F = 0,006$ ) estão aumentadas no grupo TC em relação ao grupo TRS. Enquanto os

metabólitos fenilalanina ( $P = 0,005$ ;  $F = 0,025$ ) e valina ( $P = 0,001$ ;  $F = 0,010$ ) estão aumentados no grupo TRS em relação ao grupo TC. Os metabólitos que não se encontram dentro dos *box* (estão somente escritos na figura), não foram analisados ou não obtiveram diferença significativa entre os grupos.



**Figura 16.** Via de glicose anaeróbia, ciclo do ácido cítrico e ciclo da ureia de forma detalhada, utilizando os dados obtidos da análise metabolômica e apontando os metabólitos em seus respectivos locais dentro da via de sinalização. Todos os metabólitos adentrados nos *box* demonstram valores normalizados que apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos Treinado controle (TC) e Treinado Restrição de Sono (TRS) após o período de treinamento de seis semanas. Os metabólitos que não se encontram dentro dos *box* (estão somente escritos na figura), não foram analisados ou não obtiveram diferença significativa entre os grupos. As linhas tracejadas demonstram que uma cascata de sinalização ocorre antes do próximo metabólito apontado. As linhas cheias por sua vez demonstram a imediata sequência da via metabólica.

## 8 - DISCUSSÃO

A restrição do sono é frequente no meio esportivo, especialmente nas vésperas de competições importantes e pode impactar o desempenho negativamente. Por outro lado, os mecanismos que levam à diminuição do rendimento são difíceis de serem estudados em seres humanos e não são totalmente compreendidos. Ainda que alguns estudos apontem a queda do rendimento em consequência à restrição de sono, ainda há carência por parte da literatura de estudos que realmente elucidem essa perda, acompanhada da diminuição dos estoques de glicogênio muscular, degradação proteica e produção de metabólitos específicos. Levando em conta as limitações e dificuldades que a literatura encontra em descrever distintos mecanismos em seres humanos, o presente estudo teve como diretriz estudar os efeitos da restrição de sono em animais, possibilitando completar essa lacuna do conhecimento.

Esta diretriz foi construída e, portanto, avaliou-se o efeito de seis horas de restrição de sono sobre o desempenho de força de ratos submetidos a uma periodização de treinamento resistido com o controle e monitoramento das cargas de treinamento, mensurando a expressão proteica, o estoque energético de glicogênio muscular e a produção de metabólitos. Os resultados do nosso estudo indicaram que ambos os grupos submetidos às seis semanas de treinamento físico periodizado demonstraram aumento significativo da capacidade de força, entretanto o grupo TRS apresentou piora em relação ao grupo TC após a restrição de sono. A análise das concentrações de glicogênio tanto do músculo plantar quanto do músculo sóleo não mostraram diferenças estatísticas em nenhum dos quatro grupos sugerindo que outros mecanismos, que não os estoques de glicogênio, podem ser preponderantes para explicar a piora do desempenho. Os resultados nas concentrações da proteína CLOCK não demonstraram diferença significativa para os músculos plantar e sóleo. A análise metabolômica se mostrou promissora ao postular sobre os analitos aplicados a via de sinalização da glicólise anaeróbia.

A presente pesquisa encontrou aumento da massa corporal total de todos os animais ao final das seis semanas de estudo ( $P < 0,0001$ ;  $F = 81,58$ ), o que confirma estudos anteriores (DE SOUSA NETO *et al.*, 2021; DUNCAN *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2019), que também encontraram aumento de massa corporal total nos modelos animais ao longo dos seus respectivos períodos de estudo. Contudo, ao final da sexta semana de treinamento, o grupo TC apresentou valor de massa corporal 17,8% menor

em relação ao grupo SC e 12,7% menor comparado ao grupo SRS. Essas diferenças podem ser explicadas em partes pela diferença da massa corporal dos animais no início do estudo já que no primeiro dia a massa dos animais do grupo TC era menor que a do grupo SC e TRS.

Outro fator que pode ser levado em consideração para alteração no ganho de massa corporal total é a utilização da dieta e acesso à água que os animais seguem ao longo do estudo. O trabalho conduzido permitiu livre acesso à água ao longo de todo o experimento, e também livre acesso à dieta padrão modelo AIN-93 descrito por (REEVES, 1997). Nota-se que apesar de serem utilizadas marcas distintas em outros experimentos, todos estes estudos demonstraram o mesmo perfil de livre acesso a água e dieta padrão durante seus respectivos protocolos (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016; DE SOUSA NETO *et al.*, 2021; DUNCAN *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2019; NEVES *et al.*, 2019). Tendo em vista esses dados, a dieta não parece ter sido um fator responsável pelo aumento ou qualquer outro tipo de modificação sobre a massa corporal.

Em estudos recentes realizados com modelo de exercício semelhante ao do presente trabalho, não foram observadas diferenças entre o ganho de massa corporal dos animais controle em comparação ao grupo treinado após oito e 12 semanas de treinamento (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016; DE SOUSA NETO *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2019). Portanto, os resultados podem sugerir um efeito de redução de ganho de massa corporal induzido pelo treinamento resistido pela diminuição dos estoques de tecido adiposo.

Embora o período de treinamento (oito a 12 semanas) tenha sido maior nos estudos de (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016; DE SOUSA NETO *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2019) comparado ao nosso, acreditamos que as diferenças de massa corporal encontradas não estão relacionadas com a quantidade de sessões de treinos, visto que na presente pesquisa os animais tiveram quantidade de sessões de treinos semanais equivalente aos estudos anteriores (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016; DE SOUSA NETO *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2019). Por outro lado, nosso estudo realizou um treinamento de força com base em uma periodização linear de cargas, o que pode ter favorecido às adaptações fisiológicas dos animais, como comumente observados em estudos com humanos (RHEA; ALDERMAN, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2017).

Uma das formas de desenvolvimento da capacidade de força em modelos animais é através do treinamento resistido (HORNBERGER; FARRAR, 2004; NEVES *et al.*, 2016; YASPELKIS *et al.*, 2002). O presente estudo encontrou 133 % de aumento na capacidade de força no grupo TC e 76% no grupo TRS após seis semanas de treinamento físico periodizado ( $P < 0,0001$ ;  $F = 198,9$ ). Confirmando sua eficiência assim como em estudos similares ao longo dos anos (ANTONIO-SANTOS *et al.*, 2016; DUNCAN *et al.*, 1998; HORNBERGER; FARRAR, 2004; LIMA *et al.*, 2019), que também encontraram aumentos expressivos na capacidade de força de modelos animais ao longo de períodos de treinamento resistido. Em relação à magnitude do aumento, o estudo NEVES *et al.* (2016) que avaliou ratos SHR, que são espontaneamente hipertensos, treinados três vezes por semana em dias não consecutivos ao longo de 12 semanas, demonstrou através do Teste de Força Máxima aumento de 140% na capacidade de força, valor próximo ao encontrado em nosso estudo para o grupo TC. O principal achado do trabalho validou nossa hipótese inicial. Mostramos que apesar do treinamento físico periodizado ser igual para todos os animais, seis horas de restrição de sono foi capaz de reduzir 18,4% a capacidade de força do grupo TRS em relação ao grupo TC ( $P < 0,0001$ ;  $F = 198,9$ ). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com seres humanos (LEGG; PATTON, 1986; MAH *et al.*, 2019). Trata-se de percentual relevante se visto que a diferença entre o vencedor e o perdedor de uma competição não passa de 5%.

Uma vez que a restrição de sono pode levar a fadiga muscular e central (trazendo consequências na capacidade de força), uma análise mais aprofundada deve ser discutida. ZHANG *et al.* (2016) conduziram um estudo com ratos Wistar restritos de sono por 14 horas por dia ao longo de 21 dias consecutivos utilizando o método de plataformas múltiplas. Posteriormente realizaram testes comportamentais incluindo o campo aberto e o labirinto em cruz que tem como objetivo medir o nível de ambulação total e ansiedade dos animais. Os resultados demonstraram que a ansiedade, o comprometimento da cognição espacial, o mau desempenho muscular e o declínio da atividade voluntária apresentados em ratos modelo confirmaram o diagnóstico de fadiga central.

O estudo de SHARMA *et al.* (2023) realizou um experimento com ratos Wistar. Os animais foram totalmente restritos de sono usando um método de manuseio suave, (bem próximo do utilizado em nosso estudo) no qual recebiam estimulação tátil

sempre que entravam no estado de sono, conforme detectado por registro polissonográfico ou observação visual. Os pesquisadores encontraram um aumento significativo na temperatura corporal e hipotalâmica, enquanto houve menor alteração na temperatura muscular. O ritmo circadiano do hipotálamo e da temperatura corporal dos ratos privados de sono foi perturbado, enquanto o mesmo foi preservado na temperatura muscular. SHARMA *et al.* (2023) realizaram outro estudo investigando o efeito da privação de sono de 24 horas na morfologia e na neuroquímica da junção neuromuscular usando microscopia eletrônica e imuno-histoquímica no músculo sóleo de ratos. A privação aguda do sono demonstrou alterações na estrutura sináptica, mitocôndrias, vesícula sináptica, proteínas sinápticas, lâmina basal e dobras juncionais necessárias para a transmissão neuromuscular.

A capacidade de força depende de diversas cascatas de reações, podendo comprometer o desempenho final de protocolos e testes tanto em modelos animais quanto em humanos. A perda de força em exercícios de alta intensidade pode ser decorrente de múltiplos fatores, como redução na liberação de neurotransmissores (BOONSTRA *et al.*, 2007; DESCHENES *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2023), alterações hormonais (LAMON *et al.*, 2021), ou redução de estoques energéticos como depleção de creatina fosfato e/ou glicogênio muscular (HARGREAVES; SPRIET, 2020; ORTENBLAD *et al.*, 2013).

O presente trabalho avaliou a concentração de glicogênio em dois músculos diferentes, o plantar que apresenta característica glicolítica e o sóleo que é predominantemente oxidativo (CORNACHIONE *et al.*, 2011). Não houve diferenças significativas para os valores de glicogênio entre os grupos experimentais tanto para o músculo plantar ( $P = 0,1963$ ;  $F = 1,682$ ), quanto para o músculo sóleo ( $P = 0,9072$ ;  $F = 0,1827$ ) após seis semanas de treinamento físico.

É sabido que os níveis de glicogênio muscular podem afetar diretamente a performance em diferentes modalidades de exercício (HEARRIS *et al.*, 2018; KNUIMAN *et al.*, 2015; MURRAY; ROSENBLOOM, 2018). Trata-se de polímero extensivamente ramificado de glicose que os animais utilizam como reserva de energia, sendo o análogo animal do amido (BRUST *et al.*, 2020). Embora concentrando-se em maior quantidade no fígado, os músculos esqueléticos contêm a maior quantidade de glicogênio em peso. Também está presente em níveis mais baixos em outros tecidos, como rins, coração e cérebro. As unidades de glicose no

glicogênio estão ligadas por dois tipos principais de ligações glicosídicas, a alfa-1,4 e a alfa-1,6, formando cadeias lineares e pontos de ramificação. A ramificação é um aspecto crucial do glicogênio, pois aumenta sua solubilidade e permite uma metabolização mais rápida. Importante destacar que o glicogênio desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase da glicose no corpo animal (principalmente o hepático, utilizado para a manutenção nos níveis glicêmicos seguros), sendo regulado principalmente pela insulina e pelo glucagon (DIMITRIADIS *et al.*, 2021).

Estudos clássicos conduzidos ainda na década de 60 estabeleceram os fundamentos atuais do conhecimento sobre o metabolismo do glicogênio muscular durante o exercício, servindo como base para a maioria das publicações subsequentes na área. Entre as descobertas mais significativas, destacam-se a relação linear entre o tempo de fadiga em uma intensidade específica ( $\%VO_{2\text{máx}}$ ) e as concentrações iniciais de glicogênio no músculo, bem como a diminuição dos estoques de glicogênio ao longo do tempo, aproximando-se de esgotamento no momento em que a manutenção da intensidade do exercício se torna desafiadora (BERGSTROM *et al.*, 1967). Entretanto, atualmente sabe-se que a fadiga não necessariamente está associada ao esgotamento do glicogênio muscular, uma vez que foi demonstrado que mesmo após exercícios prolongados pode-se observar uma quantidade considerável de glicogênio muscular, mesmo após a prática ter sido interrompida por exaustão (BOYAS; GUEVEL, 2011; ORTENBLAD *et al.*, 2013). Todavia, é sabido que os níveis de glicogênio muscular podem afetar a performance, sendo estratégias para reposição e aumento dos seus níveis assuntos de grande interesse pela ciência do esporte (MURRAY; ROSENBLOOM, 2018).

Especificamente sobre o exercício resistido, caracteriza-se tipicamente por breves séries de contrações musculares próximas às máximas. Durante essa modalidade, o glicogênio desempenha um papel crucial na ressíntese do pool de ATP fornecendo energia durante as contrações musculares de alta intensidade. Conforme MACDOUGALL *et al.* (1999) relatam, a maioria do ATP é derivada da glicólise. Nesse contexto, uma sessão típica de exercícios de resistência tem demonstrado reduzir os níveis de glicogênio em aproximadamente 24-40%, sendo esse valor fatalmente impactado pela duração, intensidade e volume do treinamento executado (KOOPMAN *et al.*, 2006; TESCH *et al.*, 1986). As maiores reduções de glicogênio são observadas

em treinamentos com repetições elevadas e carga moderada, principalmente em fibras do tipo II (KOOPMAN *et al.*, 2006). Portanto, a manutenção dos níveis adequados de glicogênio muscular mostra-se como fator determinante para uma boa performance durante a prática.

Diferentes estudos mostraram aumento do glicogênio muscular após 12 semanas de treinamento resistido com ratos (RIBEIRO *et al.*, 2017; YASPELKIS *et al.*, 2002). As diferenças entre os resultados dos estudos podem estar associadas aos métodos de treinamento resistido adotados nas outras pesquisas, que utilizaram diferentes aparatos de treinamento (YASPELKIS *et al.*, 2002) ou diferentes relações de volume e intensidade nas sessões de treino (RIBEIRO *et al.*, 2017). Além disso, os animais da presente pesquisa foram eutanasiados imediatamente após o teste de força. Considerando que o TFM exige uma alta demanda metabólica glicolítica (MACIEJCZYK *et al.*, 2021), é possível que o teste tenha consumido uma parte do estoque de glicogênio muscular e assim, mascarado o efeito de supercompensação advindo do treinamento. Não houve diferença na concentração de glicogênio em ambos os músculos (plantar [P = 0,1963; F = 1,682]; sóleo [P = 0,9072. F = 0,1827]) nos animais sedentários. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que ao longo de todo momento de restrição de sono, os animais estavam com livre acesso à água e ração, e também o fato de que o tempo de restrição de sono não foi suficiente para alterar a concentração de glicogênio muscular.

Nosso estudo, todavia, contraria o trabalho de (SKEIN *et al.*, 2011) que demonstrou, em humanos, redução na capacidade de força, e no estoque de glicogênio muscular após privação de sono. Até o nosso conhecimento, não observamos na literatura nenhum trabalho que tenha demonstrado o efeito da restrição de sono sobre o estoque de glicogênio muscular e sua relação com o desempenho de força em ratos e em condições similares ao nosso estudo. Na presente pesquisa, apesar da RS ter afetado o desempenho do TFM, o mesmo não foi observado com os estoques de glicogênio muscular. Assim sendo, este resultado nos leva a crer que a perda de força não foi decorrente dos estoques energéticos, mas por outros fatores como por exemplo fatores neurais e/ou hormonais (BOONSTRA *et al.*, 2007; DESCHENES *et al.*, 2002; LAMON *et al.*, 2021) ou por influência em outras vias de produção de energia no músculo esquelético.

Nesse cenário, acredita-se que os animais desenvolveram alterações comportamentais em resposta aos ciclos de luz e temperatura, a fim de atender e prever necessidades energéticas, apresentando uma vasta gama de adaptações como flutuações na produção de calor e alterações nos níveis hormonais séricos ao longo das 24 horas (BASS; TAKAHASHI, 2010). E embora inicialmente os estudos sobre esse assunto tenham concentrando-se exclusivamente no Sistema Nervoso Central (especificamente no núcleo supraquiasmático do hipotálamo) (HASTINGS *et al.*, 2018; WELSH *et al.*, 2010), atualmente é sabido que o controle do ciclo circadiano é finamente regulado em diferentes células e tecidos (conforme será melhor apresentado adiante nesta obra), e que o Sistema Nervoso Central apresenta uma função majoritária de regular esses relógios periféricos (ALBRECHT, 2012; MOHAWK *et al.*, 2012; YOO *et al.*, 2004). A descoberta de genes relacionados ao controle do ciclo circadiano iniciou-se ainda na década de 70, onde *Drosophila* mutantes que apresentavam ciclos comportamentais anormais foram estudadas, nos revelando o gene que ficou conhecido como gene *per* (KONOPKA; BENZER, 1971; REDDY, 1984; SMITH; KNOPKA, 1981). Adiante, em 1994 foi descrito o primeiro gene de controle do ciclo circadiano em mamíferos, sendo chamado de gene *clock*, identificado em camundongos com padrões circadianos alterados (VITATERNA *et al.*, 1994) e cuja a proteína *CLOCK* por ele codificada compartilha semelhanças com a proteína *PER* (codificada pelo gene *per* das *Drosophilas*) (GEKAKIS *et al.*, 1998).

Conforme comentado no parágrafo anterior, é sabido que o ciclo circadiano se trata de um processo finamente regulado, principalmente pelo sistema nervoso central. Porém, fatores externos podem impactar o ritmo circadiano, dentre eles, a prática do exercício físico (TAHARA; SHIBATA, 2018). Um recente estudo conduzido por TEIXEIRA *et al.* (2023) submeteu camundongos inoculados com células de carcinoma pulmonar de Lewis a diferentes protocolos de exercício. Ao final do estudo, os autores notaram aumento da expressão do gene *clock* nos grupos treinados (avaliado pela detecção de seu mRNA pela técnica de PCR), de modo correlato à redução do peso do tumor e aumento na produção de miocinas anti-inflamatórias. Outro recente e elegante estudo mostrou que alterações nos níveis de proteínas do ciclo circadiano estão relacionadas a alterações na performance de roedores submetidos ao exercício, ainda que os níveis de glicogênio muscular permaneçam inalterados (ADAMOVICH *et al.*, 2021). Portanto, aventamos a hipótese que nossas

intervenções poderiam estar relacionadas com alterações no conteúdo proteico de CLOCK, mesmo o glicogênio muscular mostrando-se sem variação entre os grupos experimentais.

O presente trabalho encontrou um aumento nos resíduos metabólicos de treonina ( $P = 0,000007$ ;  $F = 0,0005$ ) e lisina ( $P = 0,00003$ ;  $F = 0,0006$ ) no grupo TC em relação ao grupo TRS, o que corrobora com o trabalho de HONMA *et al.* (2020), que também demonstraram diferenças significativas entre os períodos de sono e restrição de sono para os mesmos metabólitos em doze jovens saudáveis. O estudo de HU *et al.* (2021) demonstrou regulações negativas para os valores de glutamina após o experimento com o período de restrição de sono em camundongos. Os achados do presente trabalho corroboram com os de HU *et al.* (2021) em que o grupo TC demonstra diferença significativa ( $P = 0,0007$ ;  $F = 0,001$ ) em relação ao grupo TRS. De acordo com CHOU *et al.* (2020) os níveis de ácido úrico em via de regra diminuem quando verificam-se a má qualidade do sono, o que contrapõe o presente estudo, que por sua vez, verificou o aumento significativo do ácido úrico ( $P = 0,004$ ;  $F = 0,023$ ) no grupo TC em relação ao grupo TRS. A via de glicólise anaeróbia mostrou pouco alterada quando observada através dos dados metabólitos, possivelmente reforçando o primeiro argumento de que a perda de força não foi decorrente dos estoques energéticos, mas por fatores como por exemplo neurais e/ou hormonais, ou mesmo por influência em outras vias de produção de energia no músculo esquelético.

A análise metabolômica conduzida revelou descobertas esclarecedoras sobre a diferenciação dos grupos estudados. Notavelmente, os principais metabólitos que contribuem significativamente para essa diferenciação englobam treonina, serina, lisina, tirosina, metionina, glutamina, alanina, ornitina, ácido oleico, creatinina, norvalina, valina e frutose.

Interessantemente, sabe-se que aminoácidos, especialmente aminoácidos essenciais, têm sido amplamente estudados no contexto do exercício físico e da privação de sono (BURD *et al.*, 2020; BURD *et al.*, 2019). Essas moléculas desempenham um papel crucial na síntese de proteínas, na produção de energia e em diversas vias metabólicas (CHURCH *et al.*, 2020). Em resposta a atividades físicas intensas, a demanda por aminoácidos, especialmente aminoácidos de cadeia ramificada como a valina, pode aumentar devido à quebra e reparação de proteínas musculares (MARGOLIS *et al.*, 2021). A restrição de sono tem sido associada a

alterações no metabolismo de aminoácidos, afetando potencialmente o equilíbrio energético e a homeostase metabólica geral (PENEV, 2012; SHARMA; KAVURU, 2010). Nesse sentido, a treonina, um aminoácido crucial, desempenha um papel notável na distinção entre os grupos, refletindo provavelmente seu envolvimento em várias vias metabólicas e funções celulares (ALAGAWANY *et al.*, 2020; TANG *et al.*, 2021). Da mesma forma, serina, lisina e tirosina, como aminoácidos essenciais, demonstraram sua importância nessa diferenciação, indicando seu potencial impacto nos perfis metabólicos (ALAGAWANY *et al.*, 2020; CHOI; COLOFF, 2019). A metionina, com seu papel no metabolismo de enxofre e nos processos de metilação, emerge como um jogador-chave na discriminação dos grupos (MARTINEZ *et al.*, 2017; PARKHITKO *et al.*, 2019). A glutamina, um transportador significativo de nitrogênio e regulador de diversas vias metabólicas, também contribui substancialmente para as diferenças observadas (CHAUDHRY *et al.*, 2002; YOO *et al.*, 2020).

Não obstante, o ácido oleico, um ácido graxo monoinsaturado, é um componente fundamental das membranas celulares e tem sido implicado em vários processos fisiológicos (ALVES *et al.*, 2020; MICHAUD; DENLINGER, 2006; PICCININ *et al.*, 2019). Sua presença entre os metabólitos discriminantes sugere conexões potenciais entre o metabolismo de lipídios e os efeitos do exercício físico e da privação de sono (ALVES *et al.*, 2020; MICHAUD; DENLINGER, 2006; PICCININ *et al.*, 2019). Os níveis de ácido oleico podem refletir alterações no metabolismo de lipídios, inflamação e estresse oxidativo, todos pertinentes tanto no exercício quanto na regulação do sono (JOHNSON; STOLZING, 2019). De forma interessante em nosso estudo, as alterações presentes nos metabólitos alanina, ornitina e, especialmente o ácido oleico, apontam para seu potencial envolvimento em variações metabólicas entre os grupos estudados.

Além disso, sabe-se que a creatinina é um subproduto metabólico associado à massa muscular e à função renal (PATEL *et al.*, 2013). Durante o exercício, pode haver variações nos níveis de creatinina devido a mudanças na renovação muscular e esforço (BAXMANN *et al.*, 2008). A privação de sono pode influenciar o sistema renal, afetando potencialmente a depuração de creatinina. A norvalina, um aminoácido não proteínogênico, pode estar ligada à regulação da produção de óxido nítrico e à função endotelial, o que pode ser relevante tanto no exercício quanto nos padrões de

sono (GILINSKY *et al.*, 2020; GREEN *et al.*, 2004). A creatinina, um marcador da função renal, e a norvalina, um aminoácido não proteínogênico, desempenham um papel evidente na diferenciação observada (BAXMANN *et al.*, 2008; GILINSKY *et al.*, 2020; LOUSA *et al.*, 2020; PATEL *et al.*, 2013). Já a Valina, um aminoácido essencial de cadeia ramificada, é outro metabólito que contribui para a discriminação dos grupos.

Por fim, a inclusão da frutose destaca a potencial influência do metabolismo de carboidratos na distinção dos grupos estudados (FEINMAN; FINE, 2013; HANNOU *et al.*, 2012). A frutose, uma hexose simples ( $C_6H_{12}O_6$ ), tem implicações metabólicas e pode ser influenciada pela ingestão dietética (FEINMAN; FINE, 2013; HANNOU *et al.*, 2012). Sua presença entre os metabólitos discriminantes encontrados em nosso estudo, indica alterações no metabolismo de carboidratos em resposta ao exercício e aos diferentes estímulos de privação de sono, o que corrobora com a idéia das influências do exercício físico na depleção dos estoques de glicogênio muscular e hepático, e suas conseqüentes incumbências fisiológicas e bioquímicas, além dos estímulos em diferentes vias biomoleculares.

Em resumo, a análise metabolômica realizada em nosso trabalho enfatiza a importância desses metabólitos específicos na caracterização das diferenças metabólicas entre os grupos sob investigação. Essas descobertas oferecem valiosas informações sobre os mecanismos metabólicos subjacentes e implicações potenciais para vários processos fisiológicos e patológicos. Para fortalecer essas descobertas e sua relevância no contexto do exercício e do sono, é crucial fazer referência a estudos específicos que exploraram as alterações metabólicas associadas a esses fatores.

Em conjunto, os presentes resultados oferecem significativos *insights* sobre os mecanismos moleculares e as vias de sinalização celular por meio das quais esses metabólitos são modulados e suas implicações para a saúde e o desempenho físico, em resposta à privação de sono. Além disso, investigar biomarcadores e intervenções potenciais relacionadas a esses metabólitos pode ser uma via promissora para pesquisas futuras nos campos da fisiologia do exercício e da medicina do sono.

Em relação aos metabólitos condizentes às vias do metabolismo de proteínas e aminoácidos, já é bem elucidado na literatura científica o papel do metabolismo de aminoácidos na manutenção da integridade muscular, síntese de proteínas, produção de neurotransmissores, sendo também essencial para a síntese de proteínas

musculares, recuperação após o exercício (AGUIRRE *et al.*, 2013; WEINERT, 2009). Na fisiopatologia, as deficiências de aminoácidos podem causar problemas de crescimento, fraqueza muscular, distúrbios neurológicos (ALIU *et al.*, 2018). A regulação do metabolismo de aminoácidos envolve uma rede complexa de sinalização (LING *et al.*, 2023; TOMÉ, 2021). A sinalização inicia-se com a disponibilidade de aminoácidos, que é monitorada pelas proteínas quinases denominadas mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (LING *et al.*, 2023; TOMÉ, 2021). A mTOR regula a síntese de proteínas e o balanço de energia da célula. Além disso, a sinalização de aminoácidos também envolve a ativação de proteínas quinases como a quinase ativada por AMP (AMPK), que monitora os níveis de ATP e atua para regular a homeostase energética (LING *et al.*, 2023; TOMÉ, 2021). O metabolismo de aminoácidos é regulado principalmente por vias catabólicas e anabólicas (LING *et al.*, 2023; TOMÉ, 2021). A degradação de aminoácidos ocorre principalmente no fígado e nos músculos esqueléticos, onde os aminoácidos são convertidos em intermediários do ciclo do ácido cítrico ou em glicose por gliconeogênese (LING *et al.*, 2023; TOMÉ, 2021). A disponibilidade de aminoácidos essenciais desempenha um papel crítico na síntese de proteínas musculares, o que é essencial para o crescimento muscular e a recuperação após o exercício (LING *et al.*, 2023; TOMÉ, 2021).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula crucial para a regulação do tônus vascular e da função endotelial (CYR *et al.*, 2020; FORSTERMANN; SESSA, 2012; TOUSOULIS *et al.*, 2012). O NO é sintetizado a partir da arginina, um aminoácido (CYR *et al.*, 2020; FORSTERMANN; SESSA, 2012; TOUSOULIS *et al.*, 2012). O NO regula o fluxo sanguíneo, promove a vasodilatação e melhora a função endotelial, contribuindo para a saúde cardiovascular, bem como pode melhorar o desempenho de *endurance*, melhorando o fluxo sanguíneo para os músculos durante o exercício (CYR *et al.*, 2020; FORSTERMANN; SESSA, 2012; TOUSOULIS *et al.*, 2012). Sob condições fisiopatológicas no metabolismo do NO, podem ocorrer disfunções endoteliais que correlacionam-se hipertensão e aterosclerose podem ocorrer em casos de baixa disponibilidade de NO (GALLO *et al.*, 2021; MUDAU *et al.*, 2012). A sinalização do óxido nítrico (NO) envolve a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte a arginina em NO (CYR *et al.*, 2020; FORSTERMANN; SESSA, 2012; TOUSOULIS *et al.*, 2012). A ativação de NOS é influenciada por sinais como cálcio, citocinas e estresse oxidativo, sendo o metabolismo do NO é controlado pela

disponibilidade de arginina, que é o substrato para a síntese de NO (CYR *et al.*, 2020; FORSTERMANN; SESSA, 2012; TOUSOULIS *et al.*, 2012). A arginina é obtida pela dieta e, em parte, é produzida endogenamente (BAHADORAN *et al.*, 2021; LUIKING *et al.*, 2012). A regulação da NOS é fundamental para a função endotelial e a vasodilatação, o que afeta a pressão arterial e o fluxo sanguíneo. O equilíbrio do NO é crítico para a saúde cardiovascular (GALLO *et al.*, 2021; MUDAU *et al.*, 2012).

Outro ponto importante encontrado no presente trabalho, diz acerca da creatinina e do metabolismo catabólico proteico. A creatinina é um subproduto do metabolismo da creatina em tecido muscular (BAXMANN *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2013). A sua produção e excreção são controladas pelo sistema renal (PATEL *et al.*, 2013). No que tange à saúde metabólica, a creatinina é usada como um marcador para monitorar a função renal e avaliar a massa muscular (BAXMANN *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2013). Contudo, anormais de creatinina podem indicar disfunção renal, como na insuficiência renal (BAXMANN *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2013). Por fim, a sinalização para o metabolismo da creatinina não é bem estabelecida, mas a produção de creatinina é regulada pela taxa de turnover muscular (TAEGTMEYER; ING WALL, 2013; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000). Mas, sabe-se que a ativação da via mTOR pode influenciar a síntese de creatina, que é um precursor da creatinina (CLARKE *et al.*, 2020; MARZUCA-NASSR *et al.*, 2019). A creatinina é um subproduto do metabolismo da creatina, que é sintetizada principalmente no fígado e nos rins (OSTERMANN *et al.*, 2016). A creatina é transportada para os músculos, onde é fosforilada para formar fosfocreatina, uma reserva de energia (OSTERMANN *et al.*, 2016). Durante o exercício intenso, a creatina é convertida em creatinina e excretada pelos rins (BAXMANN *et al.*, 2008). A concentração de creatinina no sangue é um marcador da função renal e da massa muscular.

Em relação aos metabólitos decorrentes das vias de metabolização de lipídios, sabe-se que a sinalização no metabolismo de lipídios é regulada principalmente por vias envolvendo o receptor ativado por proliferadores de peroxissomos e a proteína quinase AMPK (AHMADIAN *et al.*, 2013; LEE; KIM, 2010). Os PPARs são ativados por ácidos graxos e seus derivados, regulando a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e síntese de lipídios (AHMADIAN *et al.*, 2013; LEE; KIM, 2010). AMPK é ativada em situações de baixa energia, como durante o exercício, e atua para aumentar a oxidação de ácidos graxos (DAVAL *et al.*,

2006; RICHTER; RUDERMAN, 2009). O metabolismo de lipídios é controlado pelo equilíbrio entre a oxidação de ácidos graxos e a síntese de lipídios. A oxidação de ácidos graxos ocorre na mitocôndria, onde os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA e, subsequentemente, no ciclo do ácido tricarboxílico (CONSOLE *et al.*, 2020). A síntese de lipídios ocorre no citoplasma e envolve a conversão de acetil-CoA em ácidos graxos, que são então esterificados para formar triglicerídeos. O controle metabólico depende do balanço entre esses processos e é influenciado por hormônios, como a insulina e o glucagon (QAID *et al.*, 2016). O ácido oleico, um ácido graxo monoinsaturado, desempenha um papel central nessa via metabólica (ALVES *et al.*, 2020; MICHAUD; DENLINGER, 2006; PICCININ *et al.*, 2019).

Já no que tange aos metabólitos decorrentes do metabolismo de carboidratos, é sabidamente conhecido que tanto o exercício físico quanto a privação de sono pode acarretar em inúmeros efeitos no metabolismo glicolítico, tanto na glicólise, quanto na glicogenólise, bem como na glicogênese e na gliconeogênese, sendo, todos esses diferentes efeitos, dependentes, ao menos em parte, da carga de esforço imposta durante a realização dos exercícios físicos (DUGLAN; LAMIA, 2019).

Em relação aos achados acerca da glutatona e dos metabólicos decorrentes de transferências de grupos metil (conhecidos como metil-metabólicos), entende-se que as vias de sulfur e metilação envolvem a regulação de diversas enzimas, incluindo aquelas envolvidas na síntese de glutatona e na transferência de grupos metil (SBODIO *et al.*, 2019; VASKOVA *et al.*, 2023). O metabolismo da metionina começa com a conversão de metionina em S- adenosilmetionina (SAM), que é um doador de grupos metil. A SAM é utilizada em reações de metilação de DNA, RNA, proteínas e lipídios (SBODIO *et al.*, 2019; VASKOVA *et al.*, 2023). Pode-se ocorrer distúrbios do sono pela diminuição na disponibilidade de SAM, devido a mudanças no metabolismo da metionina, pode afetar a síntese de melatonina e, conseqüentemente, o ritmo do sono (GOVINDARAJULU *et al.*, 2022; POTTER *et al.*, 2016).

Mudando a perspectiva do prisma com relação a restrição de sono, percebemos que a inflamação pode ser um fator importante em resposta ao exercício e à restrição de sono, portanto a avaliação dos marcadores de inflamação pode ser relevante para entender melhor o comportamento do perfil inflamatório nos resultados. De acordo com GARBARINO *et al.* (2021) é notório que a diminuição do tempo total de sono vem sendo associada a alterações dos parâmetros imunológicos inatos e

adaptativos, promovendo um estado inflamatório crônico e um risco aumentado para processos inflamatórios. HAACK *et al.* (2007) investigaram em humanos os efeitos da restrição de sono de aproximadamente 50% de uma noite, ao longo de 10 dias consecutivos sobre mediadores inflamatórios circulantes periféricamente. Os resultados demonstraram a elevação dos níveis de concentração de Interleucina 6 (IL-6), em indivíduos restritos de sono por 4 horas ao longo de 10 dias quando comparados com o grupo controle não restrito de sono. Elevações em marcadores pró inflamatórios podem ocorrer com indivíduos saudáveis, submetidos a vigílias experimentais acima de 24 horas, assim como em durações restritas entre 25 e 50% de uma noite normal de sono com 8 horas de duração (MULLINGTON *et al.*, 2010).

Em modelos animais, podemos ver que o padrão se repete quando comparado aos humanos. YEHUDA *et al.* (2009) conduziram um experimento com ratos Long-Evans utilizando 72 horas de privação de sono, e avaliando marcadores inflamatórios. Os resultados indicaram que a privação de sono induziu uma resposta inflamatória, demonstrando elevação nos níveis de interleucinas 1 alpha e beta (IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), e fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), sendo assim, os níveis de citocinas e marcadores pró-inflamatórios foram significativamente elevados em ratos privados de sono em comparação com ratos controle. Posteriormente, PANDEY e KAR (2011) encontraram resultados que corroboram com os demonstrados nos estudos anteriores. Os pesquisadores conduziram um experimento com ratos Wistar, executando a restrição de sono para o primeiro grupo ao longo de quatro dias consecutivos, e para o segundo grupo ao longo de nove dias consecutivos. Os pesquisadores observaram que os níveis de citocinas pró inflamatórias IL-1b, IL-6 e interleucina 12 (IL-12) circulantes no sangue dos animais restritos de sono aumentaram na mesma proporção à extensão da perda de sono.

Entendendo que o processo inflamatório causado pela restrição de sono pode ser influenciado por múltiplos fatores, dentre eles o exercício físico, ritmo circadiano e ciclos sono-vigília, oportuniza-se, portanto, intervenções refinadas que considerem fatores extrínsecos e intrínsecos para sua melhoria (IRWIN, 2023). Sendo assim, levando em consideração tanto a qualidade quanto o tempo total de sono, podem-se promover ganhos de rendimento no exercício físico.

Dentre as limitações do estudo, podemos inicialmente destacar que o aumento do número de grupos nos forneceria outros lados do prisma em termos de resultados,

como por exemplo incluindo dois grupos de animais (um grupo com restrição de sono menor, e um grupo com privação total de sono). Outra limitação, foi a construção e análise de um grupo que realizasse um protocolo de treinamento aeróbio ao longo das mesmas seis semanas, para que pudéssemos comparar os diferentes métodos de treinamento, tendo assim uma descrição ainda mais detalhada do desenho experimental e colhendo uma quantidade de resultados que cobrisse ainda mais a lacuna existente na literatura. Outro fator pertinente, seria também ter investigado a expressão proteica de proteínas que controlam o relógio circadiano, como por exemplo as proteínas HIF1 $\alpha$  e PGC 1 $\alpha\beta$ . Ainda tivemos uma última limitação, que foi não ter dosado variáveis do perfil inflamatório dos animais.

Levando em conta as limitações e considerando os resultados obtidos no presente estudo, podemos entender que os dados tomados em conjunto apontam aumento da capacidade de força dos animais TC em comparação aos animais TRS, encontram-se sinais de alterações na via de glicose anaeróbia através de resíduos metabólicos, ainda que o glicogênio muscular e as concentrações de CLOCK não tenham sofrido alterações entre os grupos.

Com base nos resultados e limitações do projeto de pesquisa corrente, sugerimos pesquisas futuras com o treinamento periodizado de forma anaeróbia e aeróbia com tempos diversificados de restrição de sono. Sugere-se também maiores investigações proteicas e metabólicas, podendo detalhar com maior precisão as vias de sinalizações predominantes nos métodos de treinamento, comparando os modelos e suas respectivas respostas.

Pensando ainda na condução de futuras pesquisas, sugerimos a importância de se conduzir estudos semelhantes em seres humanos, para que assim, possam ser validados os resultados que foram observados nos modelos animais, uma vez que os mecanismos fisiológicos podem diferir (ou não) entre as espécies. Dando sequência lógica e contínua ao processo de investigação, cobrindo lacunas existentes na literatura até o momento do presente trabalho, tendo em vista a dimensão real em competições esportivas e podendo elucidar ainda mais mecanismos de ação aplicados ao treinamento de força.

A aplicação de estudos em pesquisa básica segue naturalmente o processo em pesquisa aplicada aos seres humanos, chegando ao grande objetivo final que se

passa com a investigação do rendimento esportivo em competições regionais, nacionais e internacionais.

## **9 - CONCLUSÃO**

De acordo com o resultado da presente pesquisa, nós concluimos que a restrição de sono atenua o desempenho da capacidade de força máxima em uma sessão aguda de exercício físico em animais treinados, alterando diversos metabólitos da via de glicose anaeróbia, entretanto, esta piora de desempenho não está associada com uma maior depleção de glicogênio muscular.

## 10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOVICH, Y.; DANDAVATE, V.; EZAGOURI, S.; MANELLA, G. *et al.* Clock proteins and training modify exercise capacity in a daytime-dependent manner. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 118, n. 35, p. 1-11, Aug 31 2021.

AGUIRRE; LOON, v.; BAAR. The Role of Amino Acids in Skeletal Muscle Adaptation to Exercise. **Nestlé Nutr Inst Workshop Ser**, 76, p. 85-102, 2013.

AHMADIAN, M.; SUH, J. M.; HAH, N.; LIDDLE, C. *et al.* PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nat Med**, 19, n. 5, p. 557-566, May 2013.

AJJIMAPORN, A.; RAMYARANGSI, P.; SIRIPORNPANICH, V. Effects of a 20-min Nap after Sleep Deprivation on Brain Activity and Soccer Performance. **Int J Sports Med**, 41, n. 14, p. 1009-1016, Dec 2020.

AL KHATIB, H. K.; HARDING, S. V.; DARZI, J.; POT, G. K. The effects of partial sleep deprivation on energy balance: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Clin Nutr**, 71, n. 5, p. 614-624, May 2017.

ALAGAWANY, M.; ELNESR, S. S.; FARAG, M. R.; TIWARI, R. *et al.* Nutritional significance of amino acids, vitamins and minerals as nutraceuticals in poultry production and health - a comprehensive review. **Vet Q**, 41, n. 1, p. 1-29, Dec 7 2020.

ALARCON-GOMEZ, J.; CHULVI-MEDRANO, I.; MARTIN-RIVERA, F.; CALATAYUD, J. Effect of High-Intensity Interval Training on Quality of Life, Sleep Quality, Exercise Motivation and Enjoyment in Sedentary People with Type 1 Diabetes Mellitus. **Int J Environ Res Public Health**, 18, n. 23, p. 1-11, Nov 30 2021.

ALBRECHT, U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. **Neuron**, 74, n. 2, p. 246-260, Apr 26 2012.

ALIU; KANUNGO; ARNOLD. Amino acid disorders. **Annals of Translational Medicine**, 6, n. 24, p. 1-10, 2018.

ALVES, J. L.; FIGUEIRA, A. S. C.; SOUTO, M.; LOPES, I. L. *et al.* Oleic acid enhances the production of reactive oxygen species in neuronal tissue. **Energy Reports**, 6, p. 885-890, 2020.

AMBROSE, K. R.; GOLIGHTLY, Y. M. Physical exercise as non-pharmacological treatment of chronic pain: Why and when. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, 29, n. 1, p. 120-130, Feb 2015.

ANTONIO-SANTOS, J.; FERREIRA, D. J.; COSTA, G. G.; MATOS, R. J. *et al.* Resistance Training Alters the Proportion of Skeletal Muscle Fibers But Not Brain Neurotrophic Factors in Young Adult Rats. **Journal of Strength and Conditioning Research**, 30, n. 12, p. 3531-3538, 2016.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; KASHFI, K.; GHASEMI, A. Endogenous flux of nitric oxide: Citrulline is preferred to Arginine. **Acta Physiol (Oxf)**, 231, n. 3, p. e13572, Mar 2021.

BAKER, J. S.; BUCHAN, D.; GRAHAM, M. High Intensity Exercise and Glycogen Depletion. **Single Cell Biology**, 5, n. 3, 2016.

BANGSBO; KRUSTRUP; ALONSO; SALTIN. ATP production and efficiency of human skeletal muscle during intense exercise: effect of previous exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 280, p. 956-964, 2001.

BASS, J.; TAKAHASHI, J. S. Circadian integration of metabolism and energetics. **Science**, 330, n. 6009, p. 1349-1354, Dec 3 2010.

BAXMANN, A. C.; AHMED, M. S.; MARQUES, N. C.; MENON, V. B. *et al.* Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin C. **Clin J Am Soc Nephrol**, 3, n. 2, p. 348-354, Mar 2008.

BECK; BOTEZELLI, J. D.; PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R. *et al.* Melatonin Has An Ergogenic Effect But Does Not Prevent Inflammation and Damage In Exhaustive Exercise. **Sci Rep**, 5, p. 1-10, Dec 16 2015.

BECK; DANTAS; GOBATTO. TIME OF DAY, ENVIRONMENT LUMINOSITY AND PHYSICAL EXERCISE EFFECTS ON INFLAMMATORY AND PERFORMANCE PARAMETERS OF SWIMMING RATS. **Rev. Educ. Fís/UEM**, 26, n. 1, p. 97-106, 2015.

BECK; GOBATTO, C. Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. **Acta Physiologica Hungarica**, 100, n. 4, p. 427-434, 2013.

BECK; RIBEIRO, L.; SCARIOT, P.; DOS REIS, I. *et al.* Time of day effects on aerobic capacity, muscle glycogen content and performance assessment in swimming rats. **Science and Sports**, 29, p. 319-323, 2014.

BERGSTROM; HERMANSEN; HULTMAN; SALTIN. Diet, Muscle Glycogen and Physical Performance. **Acta physiol. scand.**, 71, p. 140-150, 1967.

BERGSTROM; HULTMAN. A Study of the Glycogen Metabolism during Exercise in Man. **Acta Physiolo Scand**, 19, n. 3, p. 218-228, 1967.

BOONSTRA, T. W.; STINS, J. F.; DAFFERTSHOFER, A.; BEEK, P. J. Effects of sleep deprivation on neural functioning: an integrative review. **Cell Mol Life Sci**, 64, n. 7-8, p. 934-946, Apr 2007.

BOYAS, S.; GUEVEL, A. Neuromuscular fatigue in healthy muscle: underlying factors and adaptation mechanisms. **Ann Phys Rehabil Med**, 54, n. 2, p. 88-108, Mar 2011.

BOZEK, K.; KELBASA, S.; KRAMER, A.; HERZEL, H. PROMOTER ANALYSIS OF MAMMALIAN CLOCK CONTROLLED GENES. **Current Science**, 101, n. 11, p. 65-74, 2009.

BOZEK, K.; RELOGIO, A.; KIELBASA, S. M.; HEINE, M. *et al.* Regulation of clock-controlled genes in mammals. **PLoS One**, 4, n. 3, p. e4882, 2007.

BRIANZA-PADILLA, M.; BONILLA-JAIME, H.; ALMANZA-PEREZ, J. C.; LOPEZ-LOPEZ, A. L. *et al.* Effects of different periods of paradoxical sleep deprivation and sleep recovery on lipid and glucose metabolism and appetite hormones in rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, 41, n. 3, p. 235-243, Mar 2016.

BROUWER, A.; ASARE BEDIAKO, I.; PASZKIEWICZ, R. L.; KOLKA, C. M. *et al.* Impact of sleep deprivation and high-fat feeding on insulin sensitivity and beta cell function in dogs. **Diabetologia**, 63, n. 4, p. 875-884, Apr 2020.

BRUST, H.; ORZECZOWSKI, S.; FETTKE, J. Starch and Glycogen Analyses: Methods and Techniques. **Biomolecules**, 10, n. 7, p. 1-24, Jul 9 2020.

BULBULIAN, R.; HEANEY, J. H.; LEAKE, C. N.; SUCEE, A. A. *et al.* The effect of sleep deprivation and exercise load on isokinetic leg strength and endurance. **Eur J Appl Physiol** 73, p. 273-277, 1996.

BURD, N. A.; BEALS, J. W.; MARTINEZ, I. G.; SALVADOR, A. F. *et al.* Food-First Approach to Enhance the Regulation of Post-exercise Skeletal Muscle Protein Synthesis and Remodeling. **Sports Med**, 49, n. Suppl 1, p. 59-68, Feb 2020.

BURD, N. A.; MCKENNA, C. F.; SALVADOR, A. F.; PAULUSSEN, K. J. M. *et al.* Dietary Protein Quantity, Quality, and Exercise Are Key to Healthy Living: A Muscle-Centric Perspective Across the Lifespan. **Front Nutr**, 6, p. 1-12, 2019.

CAMERA, D. M. Anabolic Heterogeneity Following Resistance Training: A Role for Circadian Rhythm? **Front Physiol**, 9, p. 569, 2018.

CARO; NAVARROA; ROMEROC; LORENTEA *et al.* Metabolic effects of regular physical exercise in healthy population. 60, n. 4, p. 167-172, 2013.

CARVALHO-FILHO, M. A.; UENO, M.; HIRABARA, S. M.; CARVALHEIRA, J. B. C. *et al.* S-Nitrosation of the Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate 1, and Protein Kinase B/Akt. **Diabetes**, 54, p. 959-967, 2005.

CHAREST, J.; GRANDNER, M. A. Sleep and Athletic Performance: Impacts on Physical Performance, Mental Performance, Injury Risk and Recovery, and Mental Health. **Sleep Med Clin**, 15, n. 1, p. 41-57, Mar 2020.

CHASE, J. D.; ROBERSON, P. A.; SAUNDERS, M. J.; HARGENS, T. A. *et al.* One night of sleep restriction following heavy exercise impairs 3-km cycling time-trial performance in the morning. **Appl Physiol Nutr Metab**, 42, n. 9, p. 909-915, Sep 2017. Randomized Controlled Trial.

CHASIOTIS; BERGSTROM; HULTMAN. ATP utilization and force during intermittent and continuous muscle contractions. **American Physiological Society**, p. 167-174, 1987.

CHAUDHRY, F. A.; REIMER, R. J.; EDWARDS, R. H. The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. **J Cell Biol**, 157, n. 3, p. 349-355, Apr 29 2002.

CHENNAOUI, M.; VANNEAU, T.; TRIGNOL, A.; ARNAL, P. *et al.* How does sleep help recovery from exercise-induced muscle injuries? **Journal of Science and Medicine in Sport**, xxx, p. 1-6, 2021.

CHOI, B. H.; COLOFF, J. L. The Diverse Functions of Non-Essential Amino Acids in Cancer. **Cancers (Basel)**, 11, n. 5, p. 1-17, May 15 2019.

CHOU, Y. T.; LI, C. H.; SHEN, W. C.; YANG, Y. C. *et al.* Association of sleep quality and sleep duration with serum uric acid levels in adults. **PLoS One**, 15, n. 9, p. 1-13, 2020.

CHURCH, D. D.; HIRSCH, K. R.; PARK, S.; KIM, I. Y. *et al.* Essential Amino Acids and Protein Synthesis: Insights into Maximizing the Muscle and Whole-Body Response to Feeding. **Nutrients**, 12, n. 12, p. 1-14, Dec 2 2020.

CLARKE, H.; KIM, D. H.; MEZA, C. A.; ORMSBEE, M. J. *et al.* The Evolving Applications of Creatine Supplementation: Could Creatine Improve Vascular Health? **Nutrients**, 12, n. 9, p. 1-23, Sep 16 2020.

CLISH, C. B. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. **Cold Spring Harb Mol Case Stud**, 1, n. 1, p. 1-6, Oct 2015.

CONSOLE, L.; SCALISE, M.; GIANGREGORIO, N.; TONAZZI, A. *et al.* The Link Between the Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Derangement and Kidney Injury. **Front Physiol**, 11, p. 1-7, 2020.

CORNACHIONE, A. S.; BENEDINI-ELIAS, P. C.; POLIZELLO, J. C.; CARVALHO, L. C. *et al.* Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats. **Acta Histochem Cytochem**, 44, n. 2, p. 43-50, Apr 28 2011.

CYR, A. R.; HUCKABY, L. V.; SHIVA, S. S.; ZUCKERBRAUN, B. S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Crit Care Clin**, 36, n. 2, p. 307-321, Apr 2020.

DA COSTA SOUZA, A.; RIBEIRO, S. Sleep deprivation and gene expression. **Curr Top Behav Neurosci**, 25, p. 65-90, 2015.

DA SILVA, B. R. D.; NUNES, P. I. G.; SANTOS, F. A.; DE BRUIN, P. F. C. *et al.* Exercise modifies lipid and glucose metabolism alterations induced by sleep deprivation in mice. **Sleep Sci**, 15, n. 3, p. 347-350, Jul-Sep 2022.

DAMIOLA, F.; LE MINH, N.; PREITNER, N.; KORNMANN, B. *et al.* Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. **Genes Dev**, 14, n. 23, p. 2950-2961, Dec 1 2000.

DATTILO, M.; H.K.M., A.; A., M.; M., M. N. *et al.* Sleep and muscle recovery: Endocrinological and molecular basis for a new and promising hypothesis. 77, p. 220-222, 2011.

DAVAL, M.; FOUFELLE, F.; FERRE, P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. **J Physiol**, 574, n. Pt 1, p. 55-62, Jul 1 2006.

DAVIES, S. K.; ANG, J. E.; REVELL, V. L.; HOLMES, B. *et al.* Effect of sleep deprivation on the human metabolome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 29, p. 10761-10766, Jul 22 2014.

DE ARAUJO, G. G.; GOBATTO, C. A.; MARCOS-PEREIRA, M.; DOS REIS, I. G. *et al.* Interval versus continuous training with identical workload: physiological and aerobic capacity adaptations. **Physiol Res**, 64, n. 2, p. 209-219, 2015.

DE ARAUJO, G. G.; PAPOTI, M.; DOS REIS, I. G.; DE MELLO, M. A. *et al.* Short and Long Term Effects of High-Intensity Interval Training on Hormones, Metabolites, Antioxidant System, Glycogen Concentration, and Aerobic Performance Adaptations in Rats. **Front Physiol**, 7, p. 1-10, 2016.

DE CARVALHO, M. R.; DUARTE, E. F.; MENDONCA, M. L. M.; DE MORAIS, C. S. *et al.* Effects of Creatine Supplementation on the Myostatin Pathway and Myosin Heavy Chain Isoforms in Different Skeletal Muscles of Resistance-Trained Rats. **Nutrients**, 15, n. 9, p. 1-18, May 8 2023.

DE SOUSA NETO, I. V.; DURIGAN, J. L. Q.; CARREIRO DE FARIAS JUNIOR, G.; BOGNI, F. H. *et al.* Resistance Training Modulates the Matrix Metalloproteinase-2 Activity in Different Trabecular Bones in Aged Rats. **Clin Interv Aging**, 16, p. 71-81, 2021.

DEAN, B.; HARTMANN, T.; WINGFIELD, G.; LARSEN, P. *et al.* Sleep restriction between consecutive days of exercise impairs sprint and endurance cycling performance. **J Sleep Res**, 32, n. 5, p. 1-9, Oct 2023.

DESCHENES, M.; GILES, J.; MCCOY, R.; VOLEK, J. *et al.* Neural factors account for strength decrements observed after short-term muscle unloading. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, 282, p. 578-583, 2002.

DIMITRIADIS, G. D.; MARATOU, E.; KOUNTOURI, A.; BOARD, M. *et al.* Regulation of Postabsorptive and Postprandial Glucose Metabolism by Insulin-Dependent and Insulin-Independent Mechanisms: An Integrative Approach. **Nutrients**, 13, n. 1, p. 1-33, Jan 6 2021.

DUDEK, M.; MENG, Q. J. Running on time: the role of circadian clocks in the musculoskeletal system. **Biochem J**, 463, n. 1, p. 1-8, Oct 1 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

DUDZINSKA, W.; LUBKOWSKA, A.; DOLEGOWSKA, B.; SUSKA, M. *et al.* Uridine--an indicator of post-exercise uric acid concentration and blood pressure. **Physiol Res**, 64, n. 4, p. 467-477, 2015.

DUGLAN, D.; LAMIA, K. A. Clocking In, Working Out: Circadian Regulation of Exercise Physiology. **Trends Endocrinol Metab**, 30, n. 6, p. 347-356, Jun 2019. Research Support, N.I.H., Extramural Review.

DUNCAN, N. D.; WILLIAMS, D. A.; LYNCH, G. S. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. **Eur J Appl Physiol**, 77, p. 372-378, 1998.

EL-KADER, S. M. A.; AL-JIFFRI, O. H. Aerobic exercise modulates cytokine profile and sleep quality in elderly. **African Health Sciences** 19, n. 2, p. 2198-2207, 2019.

FEINMAN; FINE. Fructose in perspective. **Feinman and Fine Nutrition & Metabolism**, 10, n. 45, p. 1-11, 2013.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, 33, n. 7, p. 829-837, 837a-837d, Apr 2012.

FOSTER, C. Monitoring training in athletes with reference to overtraining syndrome. **MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE**, p. 1164-1168, 1998.

FOSTER, C.; DAINES, E.; HECTOR, L.; SNYDER, A. C. *et al.* Athletic performance in relation to training load. **Wisconsin Medical Journal**, p. 370-374, 1996.

FRANKEN, P.; TOBLER, I.; BORBELY, A. A. Effects of 12-h Sleep Deprivation and of 12-h Cold Exposure on Sleep Regulation and Cortical Temperature in the Rat. **Physiology & Behavior**, 54, p. 885-894, 1993.

GALLO, G.; VOLPE, M.; SAVOIA, C. Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. **Front Med (Lausanne)**, 8, p. 1-8, 2021.

GALLUZZI, L.; PIETROCOLA, F.; KROEMER, G. Molecular Regulation of Circadian Rhythms by Polyamines. **Cell Metab**, 22, n. 5, p. 757-758, Nov 3 2015. Research Support, Non-U.S. Gov't Comment.

GARBARINO, S.; LANTERI, P.; BRAGAZZI, N. L.; MAGNAVITA, N. *et al.* Role of sleep deprivation in immune-related disease risk and outcomes. **Commun Biol**, 4, n. 1, p. 1-17, Nov 18 2021.

GEENEN, D.; BUTTRICK, P.; SCHEUER, J. Cardiovascular and hormonal responses to swimming and running in the rat. **Journal Applied Physiology**, 65, n. 1, p. 116-123, 1988.

GEKAKIS; DAVID STAKNIS; HUBERT B. NGUYEN; FRED C. DAVIS *et al.* Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. **SCIENCE**, 280, n. 5, p. 1564-1569, 1998.

GIAMPA, S. Q.; MONICO-NETO, M.; DE MELLO, M. T.; SOUZA, H. S. *et al.* Paradoxical Sleep Deprivation Causes Cardiac Dysfunction and the Impairment Is Attenuated by Resistance Training. **PLoS One**, 11, n. 11, p. 1-22, 2016.

GILINSKY, M. A.; POLITYKO, Y. K.; MARKEL, A. L.; LATYSHEVA, T. V. *et al.* Norvaline Reduces Blood Pressure and Induces Diuresis in Rats with Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension. **Biomed Res Int**, 2020, p. 1-10, 2020.

GISKEODEGARD, G. F.; DAVIES, S. K.; REVELL, V. L.; KEUN, H. *et al.* Diurnal rhythms in the human urine metabolome during sleep and total sleep deprivation. **Sci Rep**, 5, p. 1-11, Oct 9 2015.

GONZALEZ-COVARRUBIAS, V.; MARTINEZ-MARTINEZ, E.; DEL BOSQUE-PLATA, L. The Potential of Metabolomics in Biomedical Applications. **Metabolites**, 12, n. 2, p. 1-32, Feb 19 2022.

GOROSTIAGA, E. M.; NAVARRO-AMEZQUETA, I.; CUSSO, R.; HELLSTEN, Y. *et al.* Anaerobic energy expenditure and mechanical efficiency during exhaustive leg press exercise. **PLoS One**, 5, n. 10, p. 1-11, Oct 19 2010.

GOVINDARAJULU, M.; PATEL, M. Y.; WILDER, D. M.; LONG, J. B. *et al.* Blast Exposure Dysregulates Nighttime Melatonin Synthesis and Signaling in the Pineal Gland: A Potential Mechanism of Blast-Induced Sleep Disruptions. **Brain Sci**, 12, n. 10, p. 1-22, Oct 4 2022.

GRAY, S. R.; SODERLUND, K.; WATSON, M.; FERGUSON, R. A. Skeletal muscle ATP turnover and single fibre ATP and PCr content during intense exercise at different muscle temperatures in humans. **Pflugers Arch**, 462, n. 6, p. 885-893, Dec 2011.

GREEN, D. J.; MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **J Physiol**, 561, n. Pt 1, p. 1-25, Nov 15 2004.

GREENHAFF; TIMMONS. PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX ACTIVATION STATUS AND ACETYL GROUP AVAILABILITY AS A SITE OF INTERCHANGE BETWEEN ANAEROBIC AND OXIDATIVE METABOLISM DURING INTENSE EXERCISE. **Skeletal Muscle Metabolism in Exercise and Diabetes**, p. 287-298, 1998.

HAACK; SANCHEZ; MULLINGTON. Elevated Inflammatory Markers in Response to Prolonged Sleep Restriction Are Associated With Increased Pain Experience in Healthy Volunteers. **Sleep**, 30, n. 9, p. 1145-1152, 2007.

HALSON, S. L.; JULIFF, L. E. Sleep, sport, and the brain. **Prog Brain Res**, 234, p. 13-31, 2017.

HANNOU; HASLAM; MCKEOWN; HERMAN. Fructose metabolism and metabolic disease. **The Journal of Clinical Investigation**, 128, n. 2, p. 545-555, 2012.

HARFMANN, B. D.; SCHRODER, E. A.; ESSER, K. A. Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. **J Biol Rhythms**, 30, n. 2, p. 84-94, Apr 2015. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

HARFMANN, B. D.; SCHRODER, E. A.; KACHMAN, M. T.; HODGE, B. A. *et al.* Muscle-specific loss of Bmal1 leads to disrupted tissue glucose metabolism and systemic glucose homeostasis. **Skelet Muscle**, 6, p. 12, 2016. Research Support, N.I.H., Extramural.

HARGREAVES, M.; SPRIET, L. L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. **Nat Metab**, 2, n. 9, p. 817-828, Sep 2020.

HASTINGS, M. H.; MAYWOOD, E. S.; BRANCACCIO, M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. **Nat Rev Neurosci**, 19, n. 8, p. 453-469, Aug 2018.

HEANEY, L. M.; DEIGHTON, K.; SUZUKI, T. Non-targeted metabolomics in sport and exercise science. **J Sports Sci**, 37, n. 9, p. 959-967, May 2019.

HEARRIS, M. A.; HAMMOND, K. M.; FELL, J. M.; MORTON, J. P. Regulation of Muscle Glycogen Metabolism during Exercise: Implications for Endurance Performance and Training Adaptations. **Nutrients**, 10, n. 3, p. 1-21, Mar 2 2018.

HOGENESCH; CHAN; JACKIW; BROWN *et al.* Characterization of a Subset of the Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Superfamily That Interacts with Components of the Dioxin Signaling Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, 272, n. 13, p. 8581-8593, 1997.

HONMA, A.; REVELL, V. L.; GUNN, P. J.; DAVIES, S. K. *et al.* Effect of acute total sleep deprivation on plasma melatonin, cortisol and metabolite rhythms in females. **Eur J Neurosci**, 51, n. 1, p. 366-378, Jan 2020.

HORNBERGER, T. A., Jr.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, 29, n. 1, p. 16-31, Feb 2004.

HU, S.; LI, P.; ZHANG, R.; LIU, X. *et al.* Integrated metabolomics and proteomics analysis reveals energy metabolism disorders in the livers of sleep-deprived mice. **J Proteomics**, 245, p. 1-9, Aug 15 2021.

HUE, L.; TAEGTMEYER, H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 297, n. 3, p. 578-591, Sep 2009.

IKEDA, M.; NOMURA, M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. **Biochem Biophys Res Commun**, 233, n. 1, p. 258-264, Apr 7 1997.

IRWIN, M. R. Sleep disruption induces activation of inflammation and heightens risk for infectious disease: Role of impairments in thermoregulation and elevated ambient temperature. **Temperature (Austin)**, 10, n. 2, p. 198-234, 2023.

IVY, J. L. Muscle Glycogen Synthesis Before and After Exercise. **Sports Medicine**, 11, n. 1, p. 6-19, 1991.

JENSEN, J.; RUSTAD, P. I.; KOLNES, A. J.; LAI, Y. C. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. **Front Physiol**, 2, p. 112, 2011.

JOHNSON, A. A.; STOLZING, A. The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. **Aging Cell**, 18, n. 6, p. 1-26, Dec 2019.

JORDAN, A. N.; JURCA, R.; ABRAHAM, E. H.; SALIKHOVA, A. *et al.* Effects of oral ATP supplementation on anaerobic power and muscular strength. **Med Sci Sports Exerc**, 36, n. 6, p. 983-990, Jun 2004.

JÓWKO, E.; RÓZANSKI, P.; TOMCZAK, A. Effects of a 36-h Survival Training with Sleep Deprivation on Oxidative Stress and Muscle Damage Biomarkers in Young Healthy Men. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 15, p. 2-12, 2018.

KASAI, N.; TANJI, F.; ISHIBASHI, A.; OHNUMA, H. *et al.* Augmented muscle glycogen utilization following a single session of sprint training in hypoxia. **Eur J Appl Physiol**, 121, n. 11, p. 2981-2991, Nov 2021.

KELLY, R. S.; KELLY, M. P.; KELLY, P. Metabolomics, physical activity, exercise and health: A review of the current evidence. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1866, n. 12, p. 1-17, Dec 1 2020.

KIM, J. W.; TCHERNYSHYOV, I.; SEMENZA, G. L.; DANG, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. **Cell Metab**, 3, n. 3, p. 177-185, Mar 2006. Research Support, N.I.H., Extramural.

KIND, T.; WOHLGEMUTH, G.; LEE, D. Y.; LU, Y. *et al.* FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. **Anal Chem**, 81, n. 24, p. 10038-10048, Dec 15 2009.

KNUIMAN, P.; HOPMAN, M. T.; MENSINK, M. Glycogen availability and skeletal muscle adaptations with endurance and resistance exercise. **Nutr Metab (Lond)**, 12, p. 1-11, 2015.

KONOPKA; BENZER. Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 68, n. 9, p. 2112-2116, 1971.

KOOPMAN, R.; MANDERS, R. J.; JONKERS, R. A.; HUL, G. B. *et al.* Intramyocellular lipid and glycogen content are reduced following resistance exercise in untrained healthy males. **Eur J Appl Physiol**, 96, n. 5, p. 525-534, Mar 2006.

LACOMBE, V.; HINCHCLIFF, K. W.; GEOR, R. J.; LAUDERDALE, M. A. Exercise that induces substantial muscle glycogen depletion impairs subsequent anaerobic capacity. **Equine vet. J.**, 30, p. 293-297, 1999.

LAMBERTUCCI, R. H.; LEVADA-PIRES, A. C.; ROSSONI, L. V.; CURI, R. *et al.* Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. **Mech Ageing Dev**, 128, n. 3, p. 267-275, Mar 2007.

LAMON, S.; MORABITO, A.; ARENTSON-LANTZ, E.; KNOWLES, O. *et al.* The effect of acute sleep deprivation on skeletal muscle protein synthesis and the hormonal environment. **Physiol Rep**, 9, n. 1, p. e14660, Jan 2021.

LE MOINE, C. M.; MORASH, A. J.; MCCLELLAND, G. B. Changes in HIF-1alpha protein, pyruvate dehydrogenase phosphorylation, and activity with exercise in acute and chronic hypoxia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 301, n. 4, p. R1098-1104, Oct 2011. Comparative Study  
Research Support, Non-U.S. Gov't.

LEE; KIM, S. G. AMPK-Dependent Metabolic Regulation by PPAR Agonists. **PPAR Res**, 2010, p. 1-10, 2010.

LEE, Y.; CHEN, R.; LEE, H. M.; LEE, C. Stoichiometric relationship among clock proteins determines robustness of circadian rhythms. **J Biol Chem**, 286, n. 9, p. 7033-7042, Mar 4 2011.

LEGG, S. J.; PATTON, J. F. Effects of sustained manual work and partial sleep deprivation on muscular strength and endurance. **Eur J Appl Physiol**, 56, p. 64-68, 1986.

LEPROULT, R.; CAUTER, E. V. Role of Sleep and Sleep Loss in Hormonal Release and Metabolism. **Pediatric Neuroendocrinology**, 17, p. 11-21, 2010.

LIANG, D.; CHEN, C.; HUANG, S.; LIU, S. *et al.* Alterations of Lysine Acetylation Profile in Murine Skeletal Muscles Upon Exercise. **Front Aging Neurosci**, 14, p. 1-12, 2022.

LIMA, Y. C.; KURAUTI, M. A.; DA FONSECA ALVES, G.; FERREZINI, J. *et al.* Whey protein sweetened with Stevia rebaudiana Bertoni (Bert.) increases mitochondrial biogenesis markers in the skeletal muscle of resistance-trained rats. **Nutr Metab (Lond)**, 16, p. 65, 2019.

LING, Z. N.; JIANG, Y. F.; RU, J. N.; LU, J. H. *et al.* Amino acid metabolism in health and disease. **Signal Transduct Target Ther**, 8, n. 1, p. 1-32, Sep 13 2023.

LOUSA, I.; REIS, F.; BEIRAO, I.; ALVES, R. *et al.* New Potential Biomarkers for Chronic Kidney Disease Management-A Review of the Literature. **Int J Mol Sci**, 22, n. 1, p. 1-40, Dec 22 2020.

LUIKING, Y. C.; TEN HAVE, G. A.; WOLFE, R. R.; DEUTZ, N. E. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 303, n. 10, p. E1177-1189, Nov 15 2012.

MACDONALD; HASAN; ANSARI; LONGACRE *et al.* Genetics and Biochemistry of Mauriac Syndrome. **Diabetes**, 65, n. 7, p. 1-32, 2016.

MACDOUGALL; RAY; SALE; MCCARTNEY *et al.* <Macdougall et al. 1999.pdf>. **Can J. App. Physiology**, 24, n. 3, p. 209-215, 1999.

MACIEJCZYK, M.; MICHAILOV, M. L.; WIECEK, M.; SZYMURA, J. *et al.* Climbing-Specific Exercise Tests: Energy System Contributions and Relationships With Sport Performance. **Front Physiol**, 12, p. 1-10, 2021.

MAH, C. D.; SPARKS, A. J.; SAMAAN, M. A.; SOUZA, R. B. *et al.* Sleep restriction impairs maximal jump performance and joint coordination in elite athletes. **J Sports Sci**, 37, n. 17, p. 1981-1988, Sep 2019.

MANN, S.; BEEDIE, C.; JIMENEZ, A. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. **Sports Med**, 44, n. 2, p. 211-221, Feb 2014.

MANZI, V.; IELLAMO, F.; IMPELLIZZERI, F.; D'OTTAVIO, S. *et al.* Relation between individualized training impulses and performance in distance runners. **Med Sci Sports Exerc**, 41, n. 11, p. 2090-2096, Nov 2009.

MARGOLIS, L. M.; KARL, J. P.; WILSON, M. A.; COLEMAN, J. L. *et al.* Serum Branched-Chain Amino Acid Metabolites Increase in Males When Aerobic Exercise Is Initiated with Low Muscle Glycogen. **Metabolites**, 11, n. 12, p. 1-15, Nov 30 2021.

MARGOLIS, L. M.; PASIAKOS, S. M. Optimizing intramuscular adaptations to aerobic exercise: effects of carbohydrate restriction and protein supplementation on mitochondrial biogenesis. **Adv Nutr**, 4, n. 6, p. 657-664, Nov 2013.

MARTINEZ, Y.; LI, X.; LIU, G.; BIN, P. *et al.* The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. **Amino Acids**, 49, n. 12, p. 2091-2098, Dec 2017.

MARZUCA-NASSR, G. N.; FORTES, M. A. S.; GUIMARAES-FERREIRA, L.; MURATA, G. M. *et al.* Short-term creatine supplementation changes protein metabolism signaling in hindlimb suspension. **Braz J Med Biol Res**, 52, n. 1-12, p. e8391, 2019.

MASTRANGELO, A.; FERRARINI, A.; REY-STOLLE, F.; GARCIA, A. *et al.* From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Anal Chim Acta**, 900, p. 21-35, Nov 5 2015.

MATVÉIEV, L. **Fundamentos do treino desportivo**. 1986.

MAZZOCCOLI, G.; PAZIENZA, V.; VINCIGUERRA, M. Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. **Chronobiol Int**, 29, n. 3, p. 227-251, Apr 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

MENET, J. S.; PESCATORE, S.; ROSBASH, M. CLOCK:BMAL1 is a pioneer-like transcription factor. **Genes Dev**, 28, n. 1, p. 8-13, Jan 1 2014.

MICHAUD, M. R.; DENLINGER, D. L. Oleic acid is elevated in cell membranes during rapid cold-hardening and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. **J Insect Physiol**, 52, n. 10, p. 1073-1082, Oct 2006.

MOHAWK, J. A.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. **Annu Rev Neurosci**, 35, p. 445-462, 2012.

MONICO-NETO, M.; DATTILO, M.; RIBEIRO, D. A.; LEE, K. S. *et al.* REM sleep deprivation impairs muscle regeneration in rats. **Growth Factors**, 35, n. 1, p. 12-18, Feb 2017.

MONTEIRO, A.; LOPES, C. **Periodização Esportiva: estruturação do treinamento**. AG, 2009. 8590704416.

MORVILLE, T.; SAHL, R. E.; MORITZ, T.; HELGE, J. W. *et al.* Plasma Metabolome Profiling of Resistance Exercise and Endurance Exercise in Humans. **Cell Rep**, 33, n. 13, p. 1-12, Dec 29 2020.

MUDAU, M.; GENIS, A.; LOCHNER, A.; STRIJDOM, H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. **Cardiovasc J Afr**, 23, n. 4, p. 222-231, May 2012.

MULLINGTON, J. M.; SIMPSON, N. S.; MEIER-EWERT, H. K.; HAACK, M. Sleep loss and inflammation. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 24, n. 5, p. 775-784, Oct 2010.

MURRAY, B.; ROSENBLOOM, C. Fundamentals of glycogen metabolism for coaches and athletes. **Nutr Rev**, 76, n. 4, p. 243-259, Apr 1 2018.

NALBANTOGLU. Metabolomics: Basic Principles and Strategies. **Metabolomics: Basic Principles and Strategies**, p. 1-15, 2019.

NEVES; SOUZA, M. K.; PASSOS, C. S.; BACURAU, R. F. *et al.* Resistance Training in Spontaneously Hypertensive Rats with Severe Hypertension. **Arq Bras Cardiol**, 106, n. 3, p. 201-209, Mar 2016.

NEVES, R. V. P.; ROSA, T. S.; SOUZA, M. K.; OLIVEIRA, A. J. C. *et al.* Dynamic, Not Isometric Resistance Training Improves Muscle Inflammation, Oxidative Stress and Hypertrophy in Rats. **Front Physiol**, 10, p. 4, 2019.

OHMURA, H.; MUKAI, K.; TAKAHASHI, Y.; TAKAHASHI, T. Metabolomic analysis of skeletal muscle before and after strenuous exercise to fatigue. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 1-9, May 27 2021.

ORTENBLAD, N.; WESTERBLAD, H.; NIELSEN, J. Muscle glycogen stores and fatigue. **J Physiol**, 591, n. 18, p. 4405-4413, Sep 15 2013.

OSTERMANN, M.; KASHANI, K.; FORNI, L. G. The two sides of creatinine: both as bad as each other? **J Thorac Dis**, 8, n. 7, p. E628-630, Jul 2016.

PADILHA, C. S.; CELLA, P. S.; RIBEIRO, A. S.; VOLTARELLI, F. A. *et al.* Moderate vs high-load resistance training on muscular adaptations in rats. **Life Sci**, 238, p. 1-6, Dec 1 2019.

PALACIOS, G.; PEDRERO-CHAMIZO, R.; PALACIOS, N.; MAROTO-SANCHEZ, B. *et al.* Biomarkers of physical activity and exercise. **Nutr Hosp**, 31 Suppl 3, p. 237-244, Feb 26 2015.

PANDAREESH, M. D.; ANAND, T. Ergogenic effect of dietary L-carnitine and fat supplementation against exercise induced physical fatigue in Wistar rats. **J Physiol Biochem**, 69, n. 4, p. 799-809, Dec 2013.

PANDEY, A. K.; KAR, S. K. REM sleep deprivation of rats induces acute phase response in liver. **Biochem Biophys Res Commun**, 410, n. 2, p. 242-246, Jul 1 2011.

PARKHITKO, A. A.; JOUANDIN, P.; MOHR, S. E.; PERRIMON, N. Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. **Aging Cell**, 18, n. 6, p. 1-18, Dec 2019.

PATEL, S. S.; MOLNAR, M. Z.; TAYEK, J. A.; IX, J. H. *et al.* Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: results of a cross-sectional study and review of literature. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, 4, n. 1, p. 19-29, Mar 2013.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scand J Med Sci Sports**, 3, 25, p. 1-72, Dec 2015.

PENEV, P. D. Update on energy homeostasis and insufficient sleep. **J Clin Endocrinol Metab**, 97, n. 6, p. 1792-1801, Jun 2012.

PICCININ, E.; CARIELLO, M.; DE SANTIS, S.; DUCHEIX, S. *et al.* Role of Oleic Acid in the Gut-Liver Axis: From Diet to the Regulation of Its Synthesis via Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1). **Nutrients**, 11, n. 10, p. 1-22, Sep 24 2019.

POTTER, G. D.; SKENE, D. J.; ARENDT, J.; CADE, J. E. *et al.* Circadian Rhythm and Sleep Disruption: Causes, Metabolic Consequences, and Countermeasures. **Endocr Rev**, 37, n. 6, p. 584-608, Dec 2016.

QAID, M. M.; ABDELRAHMAN, M. M.; GONZALEZ-REDONDO, P. Role of insulin and other related hormones in energy metabolism: A review. **Cogent Food & Agriculture**, 2, n. 1, p. 1-18, 2016.

RASANEN; WIITANEN; LILIUS; HYYPPA *et al.* Accumulation of Uric Acid in Plasma after Repeated Bouts of Exercise in the Horse. **Comp. Biochem. Physiol**, 11, n. 2, p. 193-144, 1996.

REDDY. Molecular Analysis of the period Locus in *Drosophila melanogaster* and Identification of a Transcript Involved in Biological Rhythms **Cell**, 38, p. 701-710, 1984.

REEVES. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 838-841, 1997.

REN, J. M.; SEMENKOVICH, C. F.; GULVE, E. A.; GAO, J. *et al.* Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. **Journal of Biological Chemistry**, 269, n. 20, p. 14396-14401, 1994.

REYNOLDS, A. C.; BANKS, S. Total sleep deprivation, chronic sleep restriction and sleep disruption. **Prog Brain Res**, 185, p. 91-103, 2010. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

RHEA, M. R.; ALDERMAN, B. L. A meta-analysis of periodized versus nonperiodized strength and power training programs. **Res Q Exerc Sport**, 75, n. 4, p. 413-422, Dec 2004.

RIBARIC, S. Physical Exercise, a Potential Non-Pharmacological Intervention for Attenuating Neuroinflammation and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease Patients. **Int J Mol Sci**, 23, n. 6, p. 1-37, Mar 17 2022.

RIBEIRO, M. B. T.; GUZZONI, V.; HORD, J. M.; LOPES, G. N. *et al.* Resistance training regulates gene expression of molecules associated with intramyocellular lipids, glucose signaling and fiber size in old rats. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 8593, Aug 17 2017.

RICHTER, E. A.; RUDERMAN, N. B. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. **Biochem J**, 418, n. 2, p. 261-275, Mar 1 2009.

ROMDHANI, M.; HAMMOUDA, O.; CHAABOUNI, Y.; MAHDOUANI, K. *et al.* Sleep deprivation affects post-lunch dip performances, biomarkers of muscle damage and antioxidant status. **Biol Sport**, 36, n. 1, p. 55-65, Mar 2019.

SANER, N. J.; LEE, M. J.; KUANG, J.; PITCHFORD, N. W. *et al.* Exercise mitigates sleep-loss-induced changes in glucose tolerance, mitochondrial function, sarcoplasmic protein synthesis, and diurnal rhythms. **Mol Metab**, 43, p. 101-110, Jan 2021.

SBODIO, J. I.; SNYDER, S. H.; PAUL, B. D. Regulators of the transsulfuration pathway. **Br J Pharmacol**, 176, n. 4, p. 583-593, Feb 2019.

SCARIOT, P. P.; DE BARROS MANCHADO-GOBATTO, F.; TORSONI, A. S.; TORSONI, M. A. *et al.* Wide housing space and chronic exercise enhance physical fitness and adipose tissue morphology in rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, 40, n. 5, p. 489-492, May 2015.

SCHRODER, E. A.; ESSER, K. A. Circadian rhythms, skeletal muscle molecular clocks, and exercise. **Exerc Sport Sci Rev**, 41, n. 4, p. 224-229, Oct 2013. Research Support, N.I.H., Extramural Review.

SCOTT, J. P.; MCNAUGHTON, L. R.; POLMAN, R. C. Effects of sleep deprivation and exercise on cognitive, motor performance and mood. **Physiol Behav**, 87, n. 2, p. 396-408, Feb 28 2006.

SHARMA; ROY, A.; SENGUPTA, T.; VISHWAKARMA, L. C. *et al.* Acute sleep deprivation induces synaptic remodeling at the soleus muscle neuromuscular junction in rats. **Sleep**, 46, n. 8, p. 1-40, 2023.

SHARMA, S.; KAVURU, M. Sleep and metabolism: an overview. **Int J Endocrinol**, 2010, p. 1-12, 2010.

SHI, G.; WU, D.; PTACEK, L. J.; FU, Y. H. Human genetics and sleep behavior. **Curr Opin Neurobiol**, 44, p. 43-49, Jun 2017. Review.

SILVERMAN, M. N.; DEUSTER, P. A. Biological mechanisms underlying the role of physical fitness in health and resilience. **Interface Focus**, 4, n. 5, p. 2-12, Oct 6 2014.

SKEIN, M.; DUFFIELD, R.; EDGE, J.; SHORT, M. J. *et al.* Intermittent-sprint performance and muscle glycogen after 30 h of sleep deprivation. **Med Sci Sports Exerc**, 43, n. 7, p. 1301-1311, Jul 2011.

SMITH; KNOPKA. Circadian Clock Phenotypes of Chromosome Aberrations with a Breakpoint at the per Locus. **Mol Gen Genet**, 183, p. 243-251, 1981.

SOUISSI, N.; SESBOUE, B.; GAUTHIER, A.; LARUE, J. *et al.* Effects of one night's sleep deprivation on anaerobic performance the following day. **Eur J Appl Physiol**, 89, n. 3-4, p. 359-366, May 2003.

TAEGTMEYER, H.; INGWALL, J. S. Creatine--a dispensable metabolite? **Circ Res**, 112, n. 6, p. 878-880, Mar 15 2013.

TAHARA, Y.; SHIBATA, S. Entrainment of the mouse circadian clock: Effects of stress, exercise, and nutrition. **Free Radic Biol Med**, 119, p. 129-138, May 1 2018. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

TANG, Q.; TAN, P.; MA, N.; MA, X. Physiological Functions of Threonine in Animals: Beyond Nutrition Metabolism. **Nutrients**, 13, n. 8, p. 1-13, Jul 28 2021.

TEIXEIRA; BIONDO; SILVEIRA; LIMA *et al.* Exercise training induces alteration of clock genes and myokines expression in tumor-bearing mice. **Cell Biochem Funct.**, 2023.

TESCH; ERLAND; COLLIANDER; KAISER. Muscle metabolism during intense, heavy-resistance exercise. **Eur J Appl Physiol**, 55, p. 362--366, 1986.

THYFAULT, J. P.; BERGOUIGNAN, A. Exercise and metabolic health: beyond skeletal muscle. **Diabetologia**, 63, n. 8, p. 1464-1474, Aug 2020.

TOMÉ. Amino acid metabolism and signalling pathways: potential targets in the control of infection and immunity. **Nutrition & Diabetes**, 11, n. 20, p. 1-7, 2021.

TOUSOULIS; KAMPOLI; PAPAGEORGIOU; STEFANADIS. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. **Current Vascular Pharmacology**, 10, p. 4-18, 2012.

TSERETELI, N.; VALLAT, R.; FERNANDEZ-TAJES, J.; DELAHANTY, L. M. *et al.* Impact of insufficient sleep on dysregulated blood glucose control under standardised meal conditions. **Diabetologia**, 65, n. 2, p. 356-365, Feb 2022.

VAN CAUTER, E.; SPIEGEL, K.; TASALI, E.; LEPROULT, R. Metabolic consequences of sleep and sleep loss. **Sleep Medicine**, 9, p. S23-S28, 2008.

VASKOVA, J.; KOCAN, L.; VASKO, L.; PERJESI, P. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. **Molecules**, 28, n. 3, p. 1-22, Feb 2 2023.

VITATERNA, M.; KING, D.; CHANG, A.; KORNHAUSER, J. *et al.* Mutagenesis and Mapping of a Mouse Gene, Clock, Essential for Circadian Behavior. **SCIENCE**, 264, p. 719-725, 1994.

VONDRA, K.; BRODAN, V.; BASS, A.; KUHN, E. *et al.* Effects of Sleep Deprivation on the Activity of Selected Metabolic Enzymes in Skeletal Muscle. **Eur J Appl Physiol**, 47, p. 41-46, 1981.

WAHREN, J.; HAGENFELDT, L.; FELIG, P. Splanchnic and leg exchange of glucose, amino acids, and free fatty acids during exercise in diabetes mellitus. **J Clin Invest**, 55, n. 6, p. 1303-1314, Jun 1975.

WANG, X.; SPARKS, J. R.; BOWYER, K. P.; YOUNGSTEDT, S. D. Influence of sleep restriction on weight loss outcomes associated with caloric restriction. **Sleep**, 41, n. 5, p. 1-23, May 1 2018.

WEINERT. Nutrition and muscle protein synthesis: a descriptive review. **J Can Chiropr Assoc**, 53, n. 3, p. 186-193, 2009.

WELSH, D. K.; TAKAHASHI, J. S.; KAY, S. A. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. **Annu Rev Physiol**, 72, p. 551-577, 2010.

WILLIAMS, T. D.; TOLUSSO, D. V.; FEDEWA, M. V.; ESCO, M. R. Comparison of Periodized and Non-Periodized Resistance Training on Maximal Strength: A Meta-Analysis. **Sports Med**, 47, n. 10, p. 2083-2100, Oct 2017.

WISHART, D. S. Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes. **Physiol Rev**, 99, n. 4, p. 1819-1875, Oct 1 2019.

WYSS; KADDURAH-DAOUK. Creatine and Creatinine Metabolism. **Physiological Reviews**, 80, n. 3, p. 1107-1213, 2000.

YASPELKIS; SINGH; TREVINO; KRISAN *et al.* Resistance training increases glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**, 175, p. 315-323, 2002.

YEHUDA, S.; SREDNI, B.; CARASSO, R. L.; KENIGSBUCH-SREDNI, D. REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. **J Interferon Cytokine Res**, 29, n. 7, p. 393-398, Jul 2009.

YOO; YAMAZAKI; LOWREY; SHIMOMURA *et al.* PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. **PNAS**, 101, n. 15, p. 5339-5346, 2004.

YOO, H. C.; YU, Y. C.; SUNG, Y.; HAN, J. M. Glutamine reliance in cell metabolism. **Exp Mol Med**, 52, n. 9, p. 1496-1516, Sep 2020.

ZAKHAROV, A. A. **Ciência do treinamento desportivo**. Grupo Palestra Sport, 2003.

ZHANG, B.; GAO, Y.; LI, Y.; YANG, J. *et al.* Sleep Deprivation Influences Circadian Gene Expression in the Lateral Habenula. **Behav Neurol**, 2016, p. 7919534, 2016.

## 11 - ANEXOS



## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da privação total de sono sobre os desempenhos de diferentes modelos de treinamento físico.", protocolada sob o CEUA nº 8196230418, sob a responsabilidade de **Paulo Daubian Rubini dos Santos Nosé** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 30/05/2018.

We certify that the proposal "Effect of total sleep deprivation on performance of different models of physical training.", utilizing Heterogenic rats, protocol number CEUA 8196230418, under the responsibility of **Paulo Daubian Rubini dos Santos Nosé** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 05/30/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2018** a **07/2021** Área: **Biologia Molecular/bioquímica**

Origem: **ICB - Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **40 a 60 dias**

N: **---**

Linhagem: **Sprague-Dawley**

Peso: **200 a 500 g**

Local do experimento: Departamento de Psicobiologia

São Paulo, 04 de junho de 2018

Prof. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo



## Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 21 de junho de 2018  
CEUA N 8196230418

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Paulo Daubian Rubini Dos Santos Nosé

Área: Biologia Molecular/bioquímica

Ronaldo Wagner Thomatieli Dos Santos (orientador)

Título da proposta: "Efeito da privação total de sono sobre os desempenhos de diferentes modelos de treinamento físico."

### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 19/junho/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicito, por meio desta carta a alteração da linhagem dos animais protocolada sob o CEUA nº 8196230418, sob a responsabilidade de Paulo Daubian Rubini dos Santos Nosé. A solicitação se faz à troca de animais Sprague-Dawley por animais Wistar, por questões burocráticas/financeiras e de logística propriamente dita. Teremos um trâmite de locomoção (visto que teremos que trazer os animais do ICB - USP), em seguida deve-se manter os animais em quarentena no novo biotério. Assim gastaremos recursos financeiros com a manutenção dos animais, extrapolando nosso orçamento. Podemos utilizar a linhagem Wistar para obter resultados semelhantes, facilitando a logística e o bom andamento do projeto."

Comentário da CEUA: "APROVADO - ESTA EMENDA ESTÁ APROVADA. A emenda solicita substituição da linhagem utilizada no Projeto. A linhagem Sprague Dawley deve ser substituída pela linhagem Wistar. Dessa forma, os animais informados no formulário devem ser substituídos pelos animais abaixo: Espécie: Ratos heterogênicos Linhagem: Wistar Gênero: Machos Peso: 200 a 500 g Idade: 40 a 60 dias N: 60".

Prof. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo