



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS CRÔNICAS

Natália Stinghen Tonet

**IMPACTOS DA PERTURBAÇÃO MODERADA E CRÔNICA DO SONO NA
HOMEOSTASE GLICÊMICA E LIPÍDICA DE RATOS E RATAS.**

Florianópolis

2023

Natália Stinghen Tonet

**IMPACTOS DA PERTURBAÇÃO MODERADA E CRÔNICA DO SONO NA
HOMEOSTASE GLICÊMICA E LIPÍDICA DE RATOS E RATAS.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Florianópolis

2023

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

Tonet, Natália Stinghen

Impactos da perturbação moderada e crônica do sono na homeostase glicêmica e lipídica de ratos e ratas. / Natália Stinghen Tonet ; orientador, Alex Rafacho, 2023.

65 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Privação de sono. 3. Ciclo Circadiano. 4. Genes Clock. 5. Metabolismo. I. Rafacho, Alex. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Natália Stinghen Tonet

Impactos da perturbação moderada e crônica do sono na homeostase glicêmica e lipídica de ratos e ratas.

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 18 de Dezembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alex Rafacho, Dr.
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rodrigo Bainy Leal, Dr.
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Monica Levy Andersen, Dra.
Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado aprovado para obtenção do título de Mestra em Bioquímica

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Alex Rafacho, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Alex, a quem devo a honra de ter sido conduzida desde a minha iniciação científica. Por me receber em sua equipe e me ensinar, de forma zelosa e respeitosa, muito além de ciência. Seus conselhos em âmbito profissional e pessoal serão carinhosamente carregados em toda minha caminhada. Por realmente ser meu “Pai Científico”.

A todos os meus colegas de laboratório que me receberam tão bem e fraternalmente. Pela convivência diária que possibilitou a criação de uma forte amizade. Aline, Carolina, Danilo, Flávia, Milena, Morgana, Priscila e Victoria, foi uma alegria enorme conviver com vocês. Nossa união tornou o trabalho mais leve, as risadas constantes e as adversidades mais superáveis.

A todos os colaboradores deste trabalho por ajudarem a torna-lo possível. Prof. Dra. Elaine Vieira, Prof. Dr. Eduardo Moreira, Prof. Dr. Gustavo dos Santos, Prof. Dr. Sebastião Taboga, Prof. Dr. Marcelo Mori, Ms. Talles Ruiz e, em especial, Dr. Henver Brunetta, pelos inúmeros conselhos na bancada e fora dela.

Ao meu pai, minha mãe e minha irmã. Por possibilitarem a realização deste sonho. Pelo apoio incansável e amor incondicional. Por entenderem minhas ausências e acolherem minhas angústias. Por serem suporte emocional e sempre incentivarem minhas escolhas.

Aos meus amigos, por me acompanharem e tornarem a caminhada mais feliz. A Amanda, por me inspirar força e resiliência.

Ao PPGBQA e sua equipe fenomenal de docentes e discentes. Ao LAMEB e sua equipe técnica. A UFSC e os seus servidores. A FAPESC pelo apoio financeiro.

Aos animais que foram utilizados nesta pesquisa.

“If sleep doesn't serve an absolutely vital function, then it is the biggest mistake the evolutionary process has ever made.”

- Prof. Allan Rechtschaffen

RESUMO

A privação de sono está entre os fatores de risco para o desenvolvimento da obesidade e diabetes mellitus tipo 2. Contudo, enquanto as evidências clínicas não conseguem isolar o fator 'privação de sono', as pré-clínicas fazem uso de abordagens intensivas (privação muito longa dentro de um período de 24 h) e agudas (durando em torno de 3 a 7 dias de intervenção). Assim, avaliamos os impactos de uma privação de sono moderada e crônica sobre parâmetros metabólicos em ratos. Para tal, utilizamos o protocolo de plataformas múltiplas para a indução da privação parcial de sono, que aqui denominaremos de perturbação do sono. Animais adultos de ambos os sexos foram submetidos diariamente a perturbação por duas horas no início (06:00-08:00 h) e duas horas ao final da fase clara (16:00-18:00 h), de segunda a sexta-feira durante 4 semanas. Durante e após este período foram avaliados o comportamento tipo ansioso e a consolidação de memória além de parâmetros biométricos, funcionais, estruturais e moleculares. A perturbação do sono resultou em redução do ganho de peso corpóreo, que se deu em paralelo a alteração no padrão de ingestão alimentar em ambos os sexos, com oscilações entre tendência de redução da ingestão alimentar durante os dias de perturbação de sono e aumento compensatório nos períodos de descanso (finais de semana). Não foram observadas diferenças significativas nos testes comportamentais. A perturbação de sono resultou em menor tolerância à glicose na segunda semana do protocolo experimental em ratas, que se normalizou ao final do protocolo. Já nos ratos, a perturbação do sono não alterou a tolerância à glicose na segunda semana, mas resultou em intolerância à glicose ao final do protocolo. Não foi observado alteração da sensibilidade à insulina em ambos os sexos na segunda semana do protocolo, mas foi encontrado maior sensibilidade à insulina ao final do protocolo nos machos. Houve diminuição da adiposidade visceral sem alteração nos valores de triacilglicerídeos plasmáticos em ambos os sexos. Não houve alteração da massa dos órgãos metabólicos, assim como alterações em parâmetros histológicos de fígado, pâncreas e glândulas adrenais. Houve redução da área e perímetro de adipócitos em ambos os sexos. Não houve alteração homogênea na expressão relativa de genes de controle circadiano e metabólicos em tecidos hepático e muscular decorrente da perturbação de sono. Assim, concluímos que um protocolo mais translacional de perturbação de sono em ratos machos e fêmeas causa redução do peso corporal relacionado ao catabolismo de tecido adiposo associado a uma transitória ou permanente intolerância à glicose em fêmeas e machos, respectivamente. Este estudo reforça a necessidade de atenção a quantidade e a qualidade do sono e seus riscos metabólicos.

Palavras chave: Ciclo Circadiano; Privação de sono; Genes Clock.

ABSTRACT

Sleep deprivation is considered a risk factor for the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. However, while clinical evidence cannot isolate the 'sleep deprivation' factor, preclinical practices make use of intensive, sometimes severe, approaches (very long deprivation within a period of 24 hours) and acute interventions (lasting around 3 to 7 days). Therefore, in this work, we intent to evaluate the impacts of moderate and chronic sleep deprivation on metabolic parameters in male and female adult rats. To this end, we used the multiple platform protocol to induce partial sleep deprivation, which we will call sleep perturbation. Adult animals were subjected to daily perturbation for two hours at the beginning (06:00-08:00 h) and two hours at the end of the light phase (16:00-18:00 h), from Monday to Friday for 4 weeks. During and after this period, anxiety-like behavior and memory consolidation were assessed in addition to metabolic parameters, including food intake, body weight, blood glucose, glucose tolerance and insulin sensitivity. Morphological and molecular parameters were also analyzed in metabolic tissues. Sleep perturbation resulted in reduced body weight gain in both sexes. This change occurred in parallel with the change in the pattern of food intake in both sexes, with oscillations between a tendency to reduce food intake during days of sleep perturbation and a compensatory increase during rest periods (weekends). No significant differences were observed in the anxiety-like behavior and short- and long-term memory consolidation tests. The sleep perturbation resulted in lower glucose tolerance in the second week of the experimental protocol in female rats, which normalized at the end of the protocol. In male rats, sleep perturbation did not alter glucose tolerance in the second week, but resulted in glucose intolerance at the end of the protocol. No change in insulin sensitivity was observed in either sex in the second week of the protocol, but greater insulin sensitivity was found at the end of the protocol only in males. There was a decrease in visceral fat deposition without changes in plasma triacylglyceride values in both sexes. There was no change in the mass of metabolic organs, as well as in histological parameters of the liver, pancreas and adrenal glands. There was a reduction in the area and perimeter of adipocytes in both sexes. There was no homogeneous change in the relative expression of circadian and metabolic control genes in the liver and muscle tissues of males and females under sleep perturbation. We conclude that a more translational sleep perturbation protocol in male and female rats causes a reduction in body weight related to adipose tissue catabolism associated with transient or permanent glucose intolerance in females and males, respectively. This study reinforces the need for attention to the quantity and quality of sleep and its metabolic risks.

Key words: Circadian Cycle; Sleep deprivation; Gene clock.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH- Hormônio adrenocorticotrófico

bHLH-PAS- Basic helix-loop-helix; Per-Arnt-Single-minded

BMAL1- Brain and muscle ARNT-like 1

CLOCK- Circadian locomotor output cycles kaput

CORT- Corticosterona

CRY- Criptochrome

DM2- Diabetes melitus tipo 2

FCTL- Fêmeas controle

FSP- Fêmeas perturbação de sono

GH- Hormônio do crescimento

GSIS- Secreção de insulina estimulada por glicose

MCTL- Machos controle

MSP- Machos perturbação de sono

NREM- Movimento não rápido dos olhos

OMS- Organização Mundial da Saúde

PER- Period

REM- Movimento rápido dos olhos

ROR- Retinoic acid receptor-related orphan receptors

SCN- Núcleo supraquiasmático

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de relógio molecular periférico.

Figura 2. Modelo de plataformas múltiplas.

Figura 3. Delineamento experimental.

Figura 4. A perturbação de sono não alterou significativamente os pesos corpóreos ao longo do protocolo.

Figura 5. A perturbação de sono causa alteração na variação do peso corpóreo.

Figura 6. A perturbação de sono afeta a ingestão alimentar de ratos e ratas.

Figura 7. AUC ($\text{g}/100\text{g}\cdot 26\text{dias}^{-1}$).

Figura 8. A perturbação do sono não alterou o desempenho durante o teste de Campo Aberto.

Figura 9. A perturbação do sono não alterou o desempenho durante o teste de Esquiva Inibitória.

Figura 10. A perturbação de sono impactou a tolerância à glicose em machos e fêmeas.

Figura 11. AUC ($\text{mg}/\text{dL}\cdot 120\text{min}$).

Figura 12. A perturbação de sono impactou a sensibilidade à insulina em machos, mas não em fêmeas, após 4 semanas de tratamento.

Figura 13. K_{ITT} ($\% \cdot \text{min}^{-1}$).

Figura 14. A perturbação de sono reduz valores de colesterol total plasmático e aumenta a corticosteronemia.

Figura 15. A perturbação de sono causa diminuição dos depósitos de adiposidade visceral de machos e fêmeas.

Figura 16. A perturbação de sono não altera a massa de órgãos metabólicos.

Figura 17. A perturbação de sono altera parâmetros morfométricos do tecido adiposo visceral de machos e fêmeas.

Figura 18. A perturbação de sono não altera parâmetros morfométricos do pâncreas endócrino de machos e fêmeas.

Figura 19. A perturbação de sono não altera a distribuição de células beta e alfa nas ilhotas pancreáticas em machos e em fêmea.

Figura 20. A perturbação de sono não altera a morfologia dos hepatócitos em machos e em fêmeas.

Figura 21. A perturbação de sono não altera parâmetros morfométricos das glândulas adrenais em machos e em fêmea.

Figura 22. A perturbação de sono altera a expressão de gene *Clock* e metabólicos em fígado de machos.

Figura 23. A perturbação de sono altera a expressão de gene *Clock* em músculo de fêmeas.

SUMÁRIO

1. Introdução e justificativa.....	13
2. Objetivos.....	20
3. Metodologia.....	21
4. Resultados.....	32
5. Discussão.....	50
6. Conclusão.....	56
7. Referencias.....	57

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O metabolismo da glicose e dos lipídeos envolve vias de sinalização metabólica que respondem a diferentes hormônios pancreáticos e intestinais. A insulina é o único hormônio hipoglicemiante descrito nos seres vivos e que também apresenta função anabólica, ou seja, estimula processos de síntese em diferentes tecidos. Em animais saudáveis, a ingestão de carboidratos eleva a glicemia, estimulando as células betas pancreáticas a secretarem insulina, regulando a utilização da glicose a partir da via glicolítica e estimulando processos de síntese e armazenamento. Ao mesmo tempo em que estimula a utilização de glicose, a insulina atenua a utilização de substratos lipídicos, que são mais demandados nos períodos interdigestivos (Rahman et al., 2021; Park et al., 2021). Nestes períodos interdigestivos há uma atenuação fisiológica da resposta da insulina em tecidos periféricos, a fim de favorecer a disponibilização de glicose ao sistema nervoso central. Durante este período, diferentes hormônios contra-regulatórios são demandados, entre eles o glucagon, secretado pelas células alfa pancreáticas, o cortisol, produzido no córtex adrenal, a adrenalina, na medula adrenal e o hormônio de crescimento (GH), na adenohipófise. Juntos, são responsáveis pela hidrólise de triacilglicerol no tecido adiposo (lipólise), disponibilizando ácidos graxos livres e glicerol na corrente sanguínea, fornecendo substratos lipídicos para a beta-oxidação e gliconeogênese, respectivamente, e pela hidrólise de glicogênio hepático e muscular (glicogenólise) (Serin; Acar Tek, 2019).

Estes momentos de disponibilidade de alimentos e jejum são facilmente preditos pelo organismo devido a sua natureza periódica, o que permite a existência de respostas programadas. A periodicidade é, principalmente, definida pelo ciclo solar e o mecanismo que regula tais respostas é o relógio circadiano (Reinke; Asher, 2019). A regulação circadiana é exercida no organismo como um todo e de forma bi-direcional, ou seja, não apenas ele controla o ritmo de processos metabólicos, como também os sinais gerados promovem uma espécie de retroalimentação que influencia todo o sistema, sendo esse processo importante para a flexibilidade metabólica (Reinke; Asher, 2019; Antza et al., 2022). Nos mamíferos, o principal relógio circadiano é o núcleo supraquiasmático (SCN), localizado no hipotálamo. O SCN recebe

sinais luminosos vindos da retina e os redireciona para outras áreas do cérebro e para os relógios moleculares periféricos em células de diferentes tecidos (Buhr; Takahashi, 2013).

Os relógios moleculares periféricos funcionam como um loop de retroalimentação transcricional comandados pelo heterodímero *CLOCK:BMAL1* (*circadian locomotor output cycles kaput: brain and muscle ARNT-like 1*), que codificam os fatores de transcrição bHLH-PAS (*basic helix-loop-helix; Per-Arnt-Single-minded*). O heterodímero se liga a sequências específicas E-Boxes nos promotores dos genes alvo, iniciando sua transcrição, entre eles *PER1/2* (*Period*), *CRY1/2* (*Cryptochromes*), *REV-ERB* (*gene NR1D1/2- nuclear receptor subfamily 1 group D member 1/2*) e *ROR* (*retinoic acid receptor-related orphan receptors*). Estas proteínas são capazes de realizar transrepressão gênica, formando assim um ciclo transcricional de retroalimentação que reinicia com a redução das concentrações das proteínas, iniciando um novo ciclo circadiano (Buhr; Takahashi, 2013; Reinke; Asher, 2019) (Figura 1). Estudos em modelos animais mutantes dos genes *Clock* e *Bmal1* mostraram marcante desregulação circadiana, associada a desfechos metabólicos, através da interação entre esses genes e a regulação da secreção de insulina e de glucagon pelas ilhotas pancreáticas (Vieira et al., 2013; Vieira et al., 2012). Camundongos knockout para o gene *Bmal1* apresentam resistência à insulina, enquanto mutantes do gene *Clock* se mostram hipoinsulinêmicos, hiperlipidêmicos, hiperglicêmicos e obesos (Perelis et al., 2015; Marcheiva et al., 2010).

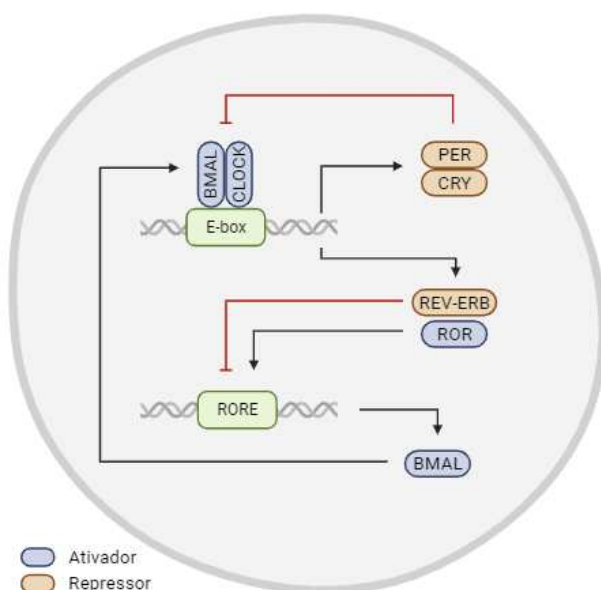


Figura 1. Esquema de relógio molecular periférico. Adaptado de Guan & Lazar (2021). Criado com BioRender. Em azul os ativadores transcricionais e em vermelho os repressores. Ao ligar-se as sequências E-box, o heterodímero CLOCK:BMAL1 ativa a transcrição de PER, CRY, REV-ERB e ROR. PER e CRY reprimem a ligação do heterodímero sobre as sequências E-box. ROR ativa e REV-ERB reprime a transcrição de BMAL, respectivamente.

Diversos estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que essa perturbação do ciclo circadiano pode ser considerada fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cânceres, além de comprometimentos cognitivos e metabólicos (Garaulet et al., 2010). Por exemplo, estudo com homens adultos saudáveis demonstrou que a desregulação circadiana aguda causada por um turno de trabalho invertido resulta em menor sensibilidade a insulina e maior glicemia de jejum (Wefers et al., 2018). Além disso, distúrbios de sono parecem estar relacionados com o aumento da incidência de sobrepeso e diabetes melitus tipo 2 (DM2), por envolver aumento do apetite e diminuição do gasto energético, podendo também envolver alterações no metabolismo da glicose e lipídeos (Knutson et al., 2007; Antza et al., 2022).

O sono é um evento natural e fisiológico que ocorre em praticamente todas as espécies de animais, periodicamente definido por regulações circadianas, homeostáticas e ritmadas, para mamíferos, em aproximadamente 24 horas (Mignot, 2008). O sono está caracterizado por alterações no estado de consciência e diminuição da sensibilidade e capacidade de resposta a estímulos externos (Gomes, 2010). O período de sono pode ser separado por duas fases principais sendo elas a fase REM (do inglês, Rapid Eye Movement), e a NREM (do inglês, Non-rapid Eye Movement) que ainda pode ser subdividida em 3 fases, sendo a última chamada de “Sono de ondas lentas” (Mignot, 2008; Gomes, 2010). Durante este período NREM a utilização de glicose cerebral diminui, assim como a redução da atividade simpática e a liberação de cortisol. Ainda, há alteração na liberação de hormônios reguladores do apetite como leptina e grelina. Neste momento a ação noturna do GH promove uma diminuição da tolerância à glicose e uma menor sensibilidade periférica à insulina (Knutson et al., 2007; Spiegel et al., 2009). Já no sono REM se observa uma maior utilização de glicose cerebral, que é propiciada pelos efeitos do GH. Nesse momento se observa também a presença de movimentos oculares, produção de sonhos, contrações musculares e cardiorrespiratórias irregulares e a inibição de neurônios motores espinhais, que leva a uma supressão do tônus muscular postural (Carskadon; Dement, 2005).

A organização do sono se dá de maneira distinta para diferentes espécies animais. Humanos apresentam um padrão majoritariamente monofásico de sono, ou seja, apresentam apenas um período de sono de longa duração ao longo de um ciclo completo circadiano. Quando não, podem apresentar padrão bifásico, com um período de sono de maior e um segundo de menor duração. Humanos também apresentam de 4 a 6 ciclos de sono REM e NREM durante estes períodos. Já outros animais, como roedores, apresentam padrão polifásico, com diversos períodos de sono de menor duração e com fragmentação grande de ciclos durante todo o dia. Para estes animais a duração do sono pode chegar a 15 das 24 horas do seu dia (Deboer, 2007; Thoth; Bhargava, 2013). Para humanos adultos o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é que as noites tenham em torno de 8 horas de duração, porém, esta necessidade individual é variável de acordo com fatores fisiológicos e socioambientais. A qualidade do sono, entretanto, depende não apenas de sua duração, mas também da continuidade e eficiência (Cappuccio et al., 2010; Buysee, 2014).

A mudança no padrão e na qualidade do sono e a diminuição das horas dormidas por noite são eventos cada vez mais prevalentes na sociedade, como evidenciado recentemente pelo isolamento social causado pela pandemia de COVID-19 (Emerson, 2020; Alqahtani et al., 2022). Por meio de uma revisão científica, foi observado haver uma relação entre o sono insuficiente ou ineficiente e o aumento da ingestão calórica, bem como um comportamento ingestivo de recompensa em humanos (Zhu et al., 2019). Tal contexto parece resultar em maior ingestão de alimentos doces e gordurosos, diminuição do gasto calórico, aumento no ganho de peso e atenuação da sensibilidade à insulina (Zhu et al., 2019). Um estudo avaliou mais de 4 mil trabalhadores da área da saúde, buscando por associações entre privação de sono e outros hábitos de vida com o desenvolvimento de parâmetros diagnósticos de síndrome metabólica (Katano et al., 2011). Os autores revelaram que, independentemente dos demais hábitos, o sono de menor duração está positivamente relacionado com estes parâmetros de síndrome metabólica tanto em homens como em mulheres. Porém, estudos clínicos são limitados por não permitirem o isolamento de fatores, estando o sono comumente associado a

diferentes fatores estressores. Ainda, existe uma dificuldade na utilização de parâmetros auto-reportados. Um estudo avaliou o sono de pacientes de modo objetivo por eletroencefalografia bem como subjetivo, de maneira auto-reportada, e observou a alta disparidade entre os dados (Miner et al., 2022).

Alternativamente aos estudos clínicos, a utilização de modelos animais se faz importante na compreensão da fisiologia por trás da privação de sono. Para este fim, foram avaliados 29 modelos de privação de sono em roedores, que consideravam desde exposição à dor, fatores ambientais e até uso de diferentes fármacos para manter os animais acordados (Revel et al., 2009). Apresentando pontos positivos e dificuldades de cada modelo, estes foram avaliados com relação a sua validade, viabilidade e aplicabilidade translacional. Um dos modelos mais utilizados é o “*vaso de flores*” (do inglês *flowerpot*). Também chamado de método de plataformas, consiste em um tanque com água contendo pequenas plataformas acima de sua superfície, podendo ser simples ou múltiplas, acomodando um ou um conjunto de animais. Estas plataformas permitem ao animal se acomodar em cima delas e inclusive ter sono NREM. Porém ao ingressar na fase REM a perda de tônus muscular faz com que o animal toque na água e desperte (Colativo et al., 2013). Sendo assim, este é um método de privação de sono REM de baixo custo, fácil aplicabilidade e boa reprodutibilidade.

A utilização de plataformas múltiplas para promover privação de sono em ratos machos adultos por 18h/dia durante 21 dias consecutivos levou a alterações características às observadas na síndrome metabólica, como aumento da glicemia e resistência à insulina (Venancio e Suchecki, 2015). Com o mesmo método (restrição de sono REM durante 21h/dia durante 15 dias consecutivos seguida por uma dieta hiperlipídica por 6 semanas em ratos) foi demonstrado que a restrição de sono potencializou os efeitos diabetogênicos causados pela dieta nestes animais (de Oliveira et al., 2015). Seis horas de privação de sono diárias durante 4 semanas consecutivas resulta em maiores valores de glicemia a partir do 4º dia, menor concentração de insulina plasmática e menor tolerância à glicose ao final do experimento de acordo com um estudo conduzido em ratos (Zhan et al., 2016). Uma única exposição de 96 h de privação de sono por plataformas simples em ratos machos resultou em

altas concentrações de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e corticosterona plasmáticos, além de maior quantidade de células reativas a orexina no hipotálamo lateral, neuropeptídeo orexígeno que participa da regulação da ingestão alimentar e metabolismo energético (Galvão et al., 2009). Já uma diminuição do ciclo claro/escuro de 12h/12h para 10h/10h em roedores durante 10 semanas consecutivas resultou no aumento do ganho de peso a partir da 6ª semana que se manteve até o fim do protocolo (Karatsoreos et al., 2011). Tais estudos estão compilados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Desfechos metabólicos em roedores submetidos a protocolos de privação de sono.

<i>Espécie</i>	<i>Desenho experimental</i>	<i>Principais desfechos</i>	<i>Autores</i>
<i>Ratos Wistar machos</i>	Privação de sono por 18h/dia durante 21 dias	Aumento da glicemia e resistência à insulina	Venancio e Suchecki, 2015
<i>Camundongos C57BL/6 machos</i>	Restrição de sono por 21h/dia durante 15 dias + dieta hiperlipídica por 6 semanas	Potencialização dos efeitos diabetogênicos da dieta	Oliveira et al., 2015
<i>Ratos Sprague-Dowley machos</i>	Privação de sono por 6h/dia durante 4 semanas	Maior glicemia, menor concentração de insulina plasmática e menor tolerância à glicose	Zhan et al., 2016
<i>Ratos Wistar machos</i>	Privação de sono por 96h contínuas	Maiores concentrações de ACTH e corticosterona, maior quantidade de células reativas a orexina	Galvão et al., 2009
<i>Camundongos C57BL/6 machos</i>	Mudança de ciclo claro/escuro de 12h/12h para 10h/10h durante 10 semanas	Maior ganho de peso a partir da 6ª semana	Karatsoreos et al., 2011

Vale ressaltar que a grande maioria dos estudos envolvendo privação de sono em modelos animais se dá de uma maneira intensiva, sendo de muitas horas por dia ou períodos muito extensos e, talvez pela intensidade, não seguem por longo prazo. Sendo assim, nos propusemos a realizar uma privação moderada e crônica em ratos e ratas adultos. O presente trabalho

buscou diferenciar-se dos demais desenhos no que se refere a uma privação menos intensiva, porém mais prolongada, com um protocolo que busca mimetizar uma rotina onde os indivíduos vão dormir mais tarde e despertam mais cedo durante os dias da semana. Por não termos condições de afirmar que se trata de uma privação sem reposição do sono, denominamos o modelo como um modelo de perturbação do sono, já que ao menos interferimos no ciclo natural do sono polifásico desses animais. Nossa hipótese é de que a perturbação de sono resulte em distúrbios metabólicos, como aumento de apetite, aumento de adiposidade e peso corporal, intolerância a glicose, entre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os impactos da perturbação do sono paradoxal sobre a homeostase glicêmica e lipídica, bem como parâmetros comportamentais em ratos e ratas adultas.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o ganho de massa corpórea e a ingestão alimentar;
- Avaliar o componente ansiogênico e a consolidação da memória de curto e longo prazo;
- Determinar parâmetros metabólicos relacionados à homeostase glicêmica como a concentração de glicose sanguínea, insulina, triacilglicerol e corticosterona plasmáticos;
- Estimar o conteúdo energético no fígado por meio da distribuição de glicogênio e o conteúdo de gordura hepáticos;
- Determinar a adiposidade visceral (gorduras perigonadal, omental e retroperitoneal);
- Determinar a tolerância à glicose e a tolerância à insulina;
- Investigar a morfologia e parâmetros morfométricos relacionados ao pâncreas endócrino;
- Avaliar a morfologia do tecido hepático bem como a distribuição de lipídeos hepáticos;
- Avaliar a morfologia dos adipócitos em tecido adiposo visceral;
- Avaliar a morfologia das glândulas adrenais;
- Quantificar genes *Clock* e metabólicos nos tecidos hepático e muscular esquelético.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Marco regulatório:

Todos os procedimentos desse estudo foram realizados de acordo com a Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais, instituído pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e pelas Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA de 2016. As metodologias experimentais (manipulação e eutanásia) seguiram as normas éticas brasileiras (Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016), bem como os procedimentos e métodos adotados conforme a resolução N° 1000, do Conselho 11 Veterinária, de 11 de maio de 2012, Art. 4º do Capítulo I que estabelecem os princípios básicos norteadores destes procedimentos, assim como àquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais do Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS). Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (protocolo nº. 9662240920).

3.2 Animais:

Foram utilizados ratos Wistar, 20 machos e 20 fêmeas, adultos, pesando 280-300g, provenientes do Biotério Central da UFSC, localizado no Campus Trindade, Florianópolis, SC. Os animais foram mantidos no Biotério setorial de ratos do LIDoC/CFS/CCB em gaiolas coletivas e em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro de 12:12 h (luzes ligadas às 6 h. e desligadas às 18 h) com livre acesso à comida (ração comercial padrão para animais de laboratório, Puro Lab 22PB; Puro Trato Nutrição Animal, Brasil) e água. A separação por gaiola aconteceu de maneira aleatória levando em consideração apenas o sexo. Ressalta-se que os animais foram examinados constantemente nos momentos de manipulação do animal (por exemplo, pesagem e administração de injeções) com o intuito de avaliar qualquer sinal de alteração no comportamento e/ou aparência natural do

animal que sugiram dor, estresse ou distresse. Foram avaliadas: a) mudanças na aparência física (ex.: ferimentos, postura, textura do pelo, pelo sujo de urina ou fezes); b) mudanças no peso corporal e outras relacionadas ao consumo de alimento e água; c) mudanças de padrões fisiológicos (ex.: frequência de respiração, frequência cardíaca, temperatura corporal); d) mudanças no comportamento normal (ex.: inatividade, automutilação, comportamento compulsivo, movimentos repetitivos ou estereotipados); e) mudanças nas respostas a estímulos (ex.: agressividade, excitabilidade). Casos em que a condição clínica de algum animal indicou necessidade de intervenção para conter a dor, o estresse ou o distresse, foram feitas consultas com o orientador e/ou médico veterinário do Centro de Ciências Biológicas (CCB-UFSC) para avaliar a necessidade de administração de algum medicamento ou eutanásia humanitária. Em caso pertinente, o animal foi removido do projeto e eutanasiado (human endpoint) através da administração de dose excessiva de uma mistura dos anestésicos cetamina (150 mg/kg; i.p.) e xilazina (30 mg/kg; i.p.) como preconizado em ENV/JM/MONO (2000) da OECD “Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation” seguido por decapitação em guilhotina.

3.3 Tamanho amostral:

O número de animais para cada grupo experimental foi o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo. Para o cálculo amostral *a priori*, consideramos o erro alpha (erro do tipo I) de 0,05 e erro beta (erro tipo II) de 0,20, uma estimativa de desvio padrão de 10% e a mínima diferença a ser detectada na ordem de 15% e com base nos valores obtidos pela calculadora disponível online (<http://estatistica.bauru.usp.br/calculoamostral/calculos.php>), obtivemos o número de 10 animais por grupo.

3.4 Grupos e delineamento experimentais:

Grupo Controle (CTL) – 10 machos (MCTL) e 10 fêmeas (FCTL) foram alocados em gaiolas para ratos (5 animais por gaiola) e permaneceram no mesmo ambiente que os animais expostos à perturbação do sono e em mesmas condições de privação temporária de água e ração.

Grupo de Perturbação do Sono (SP) – o mesmo número de animais machos (MSP) e fêmeas (FSP) foram submetidos ao método de plataformas múltiplas, adaptado de Zhang *et al.* (2018). O aparato foi montado utilizando uma caixa plástica contendo 5 plataformas de plástico fixas a uma base de metal, permitindo a remoção das mesmas para limpeza ao término de cada exposição. As medidas da caixa podem ser vistas na Figura 2 a seguir. A água foi mantida 1 cm abaixo da superfície das plataformas e a uma temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante todo o período de exposição. As plataformas tinham 6 cm de diâmetro equidistantes a 10 cm entre si, o que permite que os animais troquem de plataformas uns com os outros. Os animais (5 animais por caixa, ou seja, todas as plataformas ocupadas) eram alocados nessas caixas pelo período de 2 h no período equivalente ao início da fase de descanso dos roedores (entre 06:00 e 08:00 h) e 2 h no fim da fase de repouso (entre 16:00 e 18:00 h), totalizando 4 h de perturbação de sono paradoxal (REM) diariamente sem qualquer alteração do ciclo de luz em relação ao grupo controle. Os animais foram gentilmente secos com toalha pelos manipuladores antes de serem reconduzidos às gaiolas tradicionais.

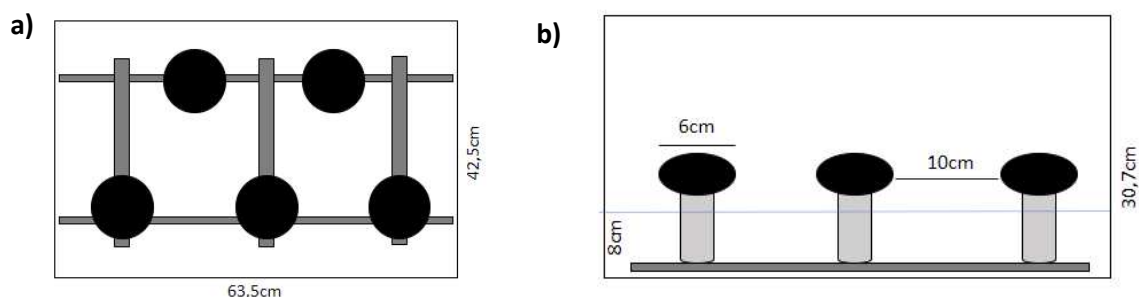


Figura 2. Modelo de plataformas múltiplas. (2a) vista superior; (2b) vista frontal. Adaptado de Zhang *et al.* (2018).

Condicionamento: todos os animais dos grupos SP passaram por condicionamento prévio, onde foram expostos ao aparato por 10 min diários, durante 3 dias, nos dias que antecederam o início do protocolo.

Desenho experimental: o protocolo de perturbação do sono foi realizado durante cinco dias consecutivos (de segundas-feiras as sextas-feiras), com períodos de descanso pleno durante dois dias (sábados e domingos). Durante o período de descanso pleno do sono e enquanto não estiveram expostos ao aparato, os animais permaneceram alojados em gaiolas domésticas de ratos. A

duração do experimento foi de 26 dias. O desenho experimental com as variáveis e abordagens experimentais é mostrado na Figura 3 a seguir.

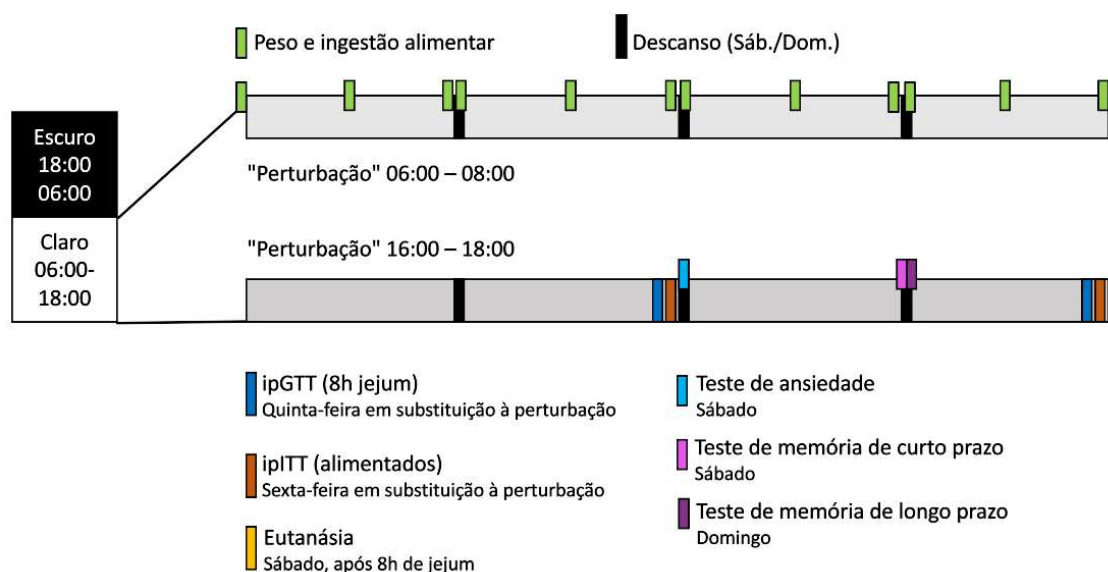


Figura 3: Delineamento experimental.

Os animais foram avaliados quanto ao peso corpóreo e ingestão alimentar 3 vezes por semana (sendo 2 vezes durante a semana e uma vez no final de semana) e foram submetidos ao teste de tolerância à glicose e à insulina em 2 ocasiões separadas: no final do segundo e quarto ciclos, nas quintas e sextas-feiras, respectivamente. Também foram submetidos aos testes de campo aberto no sábado correspondente ao segundo ciclo e ao teste de memória de curto prazo (sábado) e longo prazo (domingo) correspondente ao final do terceiro ciclo. No dia seguinte ao último dia de perturbação (final dos 4 ciclos), os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e de tecidos como descrito adiante.

3.5 Parâmetros metabólicos e estruturais:

Peso corpóreo: foi realizada determinação do peso corpóreo 3 vezes por semana (quartas-feiras, sextas-feiras e domingos) as 6 horas da manhã, iniciando no dia anterior ao de início do experimento até o momento da eutanásia em balança eletrônica digital (TECNAL, Campinas, SP, Brasil).

Ingestão alimentar: a ingestão alimentar foi verificada 3 vezes por semana juntamente com a aferição da massa corpórea até o momento da eutanásia como descrito anteriormente. Foi realizada pela pesagem da ração

remanescente (não ingerida) descontada do total daquela depositada no dia anterior. A diferença representa a quantidade ingerida por gaiola diariamente. A quantidade média de ração ingerida por animal foi obtida através do seguinte cálculo $[(\text{total de ração ingerida}/\text{número de animais na gaiola})/\text{peso individual de cada animal}] * 100$. Os resultados foram expressos em gramas de ração ingeridos por 100 g de peso corpóreo e posteriormente normalizados a partir dos valores basais.

Glicose sanguínea: A glicose sanguínea foi aquela obtida nos períodos basais do teste de tolerância à insulina (glicemia em estado alimentado) e do teste de tolerância à glicose (glicemia em jejum) por meio do sistema de fitas (monitor digital) “Accu-Check Performa” (ROCHE, Brasil) a partir de gota de sangue obtida por um pique da ponta da cauda ($<0,05$ mm) nos dias 11 e 25 (GTT) e 12 e 26 (ITT).

Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT): foi realizado nos dias 11 e 25 em animais jejuados (8 h) e acordados. A determinação da glicemia no tempo 0 (basal) ocorreu como descrito anteriormente. Imediatamente, foi administrada solução de glicose 50% (2 g/kg de peso corpóreo, via intraperitoneal) e coletada uma nova gota de sangue da ponta da cauda aos 30, 60 e 120 min para determinação dos valores glicêmicos como descrito anteriormente. A área abaixo da curva foi calculada pelo sistema trapezoidal a partir de valores normalizados pela glicemia basal como descrito previamente (Natividade da Silva et al., 2019; Motta et al., 2015).

Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT): foi realizado nos dias 12 e 26 em animais alimentados e acordados. Os animais tiveram a glicemia basal obtida como descrito anteriormente e imediatamente em seguida, receberam uma injeção intraperitoneal de insulina humana regular (Humulin® R) equivalente a 1 UI/Kg de peso corpóreo. Uma gota de sangue foi coletada para dosagem das concentrações de glicose sanguínea nos tempos 10, 20 e 40 min. A constante de decaimento de glicose (K) foi calculada a partir do “slope” da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformados entre na fase linear de decaimento (Santos et al., 2021).

3.6 Testes de ansiedade e consolidação da memória:

Campo aberto (*open field*): foi realizado no dia 13 em animais alimentados e acordados. O aparato, feito de madeira e revestido com insulfilm plástico (60 x 60 cm), está composto por 16 quadrados (15 x 15 cm), e paredes de altura de 50 cm. Cada animal foi colocado no centro do campo aberto e as seguintes variáveis foram registradas por 5 minutos: número de quadrados periféricos (adjacentes às paredes) cruzados (locomoção periférica), número de quadrados centrais (longe das paredes) cruzados (locomoção central). Com estes dados, a locomoção total (periférica + central) e a porcentagem de locomoção central em relação à locomoção total (locomoção periférica mais locomoção central) foram calculadas. Um cruzamento é registrado quando o animal atravessa o quadrado com as quatro patas.

Memória de curto e longo prazo (*step-down*): o teste foi realizado nos dias 20 e 21 em uma caixa de metal e acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm³. Parte da base do aparelho possui uma grade com barras de bronze com 1 mm de diâmetro, com espaçamento de 1 cm entre elas, e de uma plataforma metálica. O animal é colocado sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade (com as quatro patas) é cronometrado. Na sessão de treino, imediatamente após o animal descer sobre a grade, ele é estimulado com um leve choque nas patas (0,3 mA) durante 2 segundos. Cada animal foi treinado e após 1,5 h (no sábado ao final da terceira semana) e 24 h (no domingo) foram testados, para avaliação das memórias de curta e longa duração, respectivamente. Para isto o mesmo procedimento foi aplicado, mas omitindo-se o choque, sendo novamente cronometrado o tempo que o animal leva para descer da plataforma. Em casos específicos em que o animal não desceu da plataforma durante as sessões de teste, um tempo máximo de 180 segundos foi aguardado para que o animal seja retirado da caixa. Neste teste o aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma, ou fazê-lo após um período maior do que aquele observado na sessão de treino (Roesler *et al.*, 1999).

3.7 Eutanásia e quantificações *ex vivo*:

Eutanásia: a eutanásia dos animais ocorreu por exposição a anestésico inalatório Isoflurano (Instituto BioChimico Indústria Farmacêutica Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) seguida de decapitação em guilhotina para obtenção do

sangue troncal em tubos de vidro previamente tratados com solução salina e de EDTA-NaF (Glistab, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O sangue foi centrifugado a 1.600 rpm por 10 minutos (centrífuga de ângulo fixo modelo ML4000) em temperatura ambiente e as alíquotas de plasma foram armazenadas a -80°C até o momento das dosagens plasmáticas.

Insulina, colesterol, triacilglicerol e corticosterona plasmáticos: As concentrações de triacilglicerol (kit comercial, Labtest), colesterol (kit comercial, Labtest), a insulina (ELISA kit, RAB0904; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a corticosterona plasmática (ELISA kit, 80554, Crystal Chem, Elk Grove Village, IL, EUA) foram quantificados de acordo com instruções dos fabricantes dos kits e publicações prévias (Rafacho et al., 2008; Rafacho et al., 2009).

Massa absoluta e relativa de órgãos metabólicos: após coleta de sangue os tecidos e órgãos de interesse (gordura perigonadal, gordura retroperitoneal, gordura omental, pâncreas, coração, baço e glândulas adrenais) foram cuidadosamente removidos e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL, Campinas, SP, Brasil).

Gordura Hepática: aproximadamente 100 mg de fígado foi homogeneizado (UltraTurrax, IKA®) em 700 μl de NaCl 1M seguido pela adição de 2 ml de solução metanol/clorofórmio (1:2, v/v). Após centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos, foi coletada a fase metanólica (contém os lípidos) e realizada a secagem por meio de banho maria fervente. Em seguida foi realizada suspensão em 500 μl de solução Triton X100/metanol (2:1) e dosagem do triacilglicerol como descrito para o plasma (Rafacho et al., 2008; Rafacho et al., 2009).

Densidade e morfologia das ilhotas pancreáticas: para o estudo de aspectos morfológicos e a distribuição das células β e α , foram coletados os pâncreas de cada grupo e os linfonodos e o tecido adiposo foram removidos para posterior pesagem do órgão inteiro. A porção esplênica do pâncreas foi cuidadosamente selecionada e em seguida os fragmentos fixados por imersão em formalina neutra tamponada 10% pelo período de 48 h a temperatura ambiente, desidratados e embebidos em parafina. Três secções no maior plano do fragmento (5 μm) foram obtidas em Micrótomo Rotativo RM2255 (Leica

Biosystems, Deer Park, IL, USA) e aderidas em lâminas sinalizadas individuais. Uma secção recebeu coloração de Tricrômico de Gömori e as outras foram imunomarcadas para insulina e glucagon para realização de análise morfológica e estereológica (Rafacho et al., 2008; Rafacho et al., 2009). Após coradas, as lâminas foram digitalizadas em escâner Olympus BX61VS (Olympus Corp., Tóquio, Japão).

Análises morfométricas: as imagens digitalizadas foram analisadas no software OlyVIA versão 3.4.1 (Olympus Corp., Tóquio, Japão). A área total de tecido pancreático (μm^2) foi mensurada excluindo campos onde houvesse tecido adiposo, linfático, hemácias e paredes de vasos. Para as ilhotas foram consideradas todas as estruturas endócrinas com 3 ou mais células e coletados dados de área total (μm^2) e perímetro (μm). A massa de pâncreas endócrino (mg) foi obtida por meio da somatória da área de ilhotas dividida pela área total do pâncreas, resultando na porcentagem endócrina. Posteriormente, foi obtida a massa absoluta a partir da multiplicação da % do tecido endócrino pela massa do pâncreas. A massa de pâncreas endócrino também foi normalizada pelo peso corpóreo pelo seguinte cálculo: [(massa do pâncreas endócrino/peso individual do animal)*100].

Imunomarcção: a distribuição celular da insulina e do glucagon foi conduzida utilizando-se o método padrão de imunoperoxidase indireta. Após remoção da parafina, as secções foram reidratadas e, após lavagem com tampão fosfato 0,01M (PBS, pH 7,4) as lâminas foram tratadas com tampão Citrato (Citrato de Sódio 10mM, pH 6,0) em água fervente para recuperação antigênica por 20 min. Posteriormente, os cortes foram permeabilizados em PBS 0,2% Triton-100 por 10 min e bloqueados com PBS 0,05% Tween 20 e 5% albumina, seguido de 2 h de incubação com anticorpo primário em temperatura ambiente (TA). Os anticorpos utilizados foram anti-insulina e anti-glucagon (sc-9168 e sc-7779R, Santa Cruz biotechnology, CA, USA) diluídos a 1:50 e 1:200 em PBS 2% albumina. Após lavagens com PBS, as secções foram bloqueadas para a peroxidase endógena (PBS 0,3% H_2O_2) e incubadas com anticorpo secundário diluído a 1:100 em PBS 2% albumina por 1 h (sc-2491, Santa Cruz biotechnology). As secções então foram tratadas com sistema ABC de acordo com instruções do fabricante (Santa Cruz biotechnology). Os complexos

biotina-estreptoavidina foram detectados com solução diaminobenzidina (DAB) 0,1% DAB e 0,02% H₂O₂ em PBS. Finalmente, as secções foram rapidamente coradas com Hematoxilina de Harris e montadas para observação microscópica (Rafacho et al., 2009).

Distribuição e estimativa da proporção de células β e α : as imagens para documentação foram obtidas por câmera CCD acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX-43 (Olympus Corp.) e analisadas em software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA). Foram fotografadas todas as ilhotas com marcações visíveis em cada secção. Foram quantificadas as áreas totais de cada ilhota, assim como as áreas contendo marcações positivas para insulina ou glucagon. As proporções foram obtidas multiplicando-se as áreas de células β ou α por 100 e dividindo-as pela área total de cada ilhota.

Determinação morfológica e deposição de glicogênio hepático: fragmentos de fígado foram coletados no dia da eutanásia e fixados em formalina tamponada, pH 7.4, desidratados com bateria de álcoois em diferentes concentrações e incluídos em parafina. Secções (5 μ m) do fígado de cada grupo experimental foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica Biosystems) e aderidas em lâminas de vidro. Em seguida foram submetidas ao procedimento de coloração de ácido periódico de Schiff (PAS) para evidenciar o glicogênio intracitoplasmático. As secções coradas foram fotografadas em microscópio Olympus BX41 (Olympus) para posterior análise qualitativa.

Determinação da morfologia dos adipócitos em tecido adiposo visceral: fragmentos de tecido adiposo visceral foram coletados no dia da eutanásia e fixados como descrito para o fígado. Secções (5 μ m) do tecido de cada grupo experimental foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica Biosystems) e aderidas em lâminas de vidro. Em seguida foram submetidas ao procedimento de coloração de Hematoxilina e Eosina para posteriores análises morfométricas dos adipócitos. As imagens para documentação foram obtidas por câmera CCD acoplada ao fotomicroscópio Olympus BX-43 (Olympus Corp.) e analisadas em software ImageJ (NIH). Foram analisadas 3 secções diferentes para cada animal e coletados dados de área total (μ m²) e perímetro (μ m) de cada adipócito, assim como o número de adipócitos por secção. Foi realizada

estratificação dos adipócitos por tamanho de acordo com valores pré-definidos nas seguintes faixas: <1000 μm^2 , de 1000 a 1999 μm^2 , de 2000 a 2999 μm^2 , de 3000 a 3999 μm^2 , de 4000 a 4999 μm^2 e >5000 μm^2 .

Parâmetros morfométricos das glândulas suprarrenais: as glândulas suprarrenais foram coletadas no dia da eutanásia e fixadas como descrito previamente. Os blocos contendo glândulas adrenais foram seccionadas (5 μm , com intervalos de 75 μm) em micrótomo rotativo (Leica Biosystems) e os cortes aderidos em lâminas de vidro para histologia. Foi obtido, em média, onze cortes por adrenal. Em seguida foram submetidas ao procedimento de coloração de Tricrômico de Gömori para análise morfométrica. Em relação aos parâmetros morfométricos das glândulas adrenais, foram analisadas oito medidas sendo: 1 a 4 – espessura do córtex obtida em 4 eixos (superior, direita, inferior, esquerda); 5 e 6 – comprimento e largura da medula; 7 e 8 – comprimento e largura da adrenal. As análises foram realizadas com apoio de microscopia de luz, a partir de uma lente ocular com retículo quadricular contendo 100 pontos de cruzamento. Para as medidas de adrenal e medula inteira foi utilizada a objetiva de 4x, enquanto para as medidas de espessura do córtex foi utilizada a objetiva de 10x. Com essas medidas pode-se inferir se houve diferenças na espessura do córtex bem como do diâmetro da adrenal e da medula.

Expressão Gênica por PCR em tempo real: fragmentos de fígado (mesmo lobo para todos os animais) e músculo (gastrocnêmico) foram homogeneizados com T18 UltraTurrax (IKA) e o RNA total foi extraído dos tecidos usando Trizol de acordo com as instruções do fabricante (TRIZOL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA), foi quantificado usando Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, MA) e 1 μg foi utilizado para produzir cDNA através de kit de transcrição reversa de cDNA (AB Applied Biosystems, EUA). O PCR em tempo real foi realizado usando CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA) utilizando o cDNA previamente diluído e incubado com primers associados ao QuantiNova SYBR Green PCR kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Os alvos de mRNA foram normalizados pela expressão do gene de controle interno, o gene RPLP0 (proteína ribossômica grande P0, pseudônimo 36B4), e expressos como valores relativos utilizando o

método 2DDCt (Livak; Schmittgen, 2001). Possíveis alterações na expressão dos genes são expressos relativamente aos respectivos grupos controle. Os genes analisados foram: *Nr1d2* (F- AGGGAGGATGCATCTGGTTTG; R- GTAGGGAACCCCACTTGAGC), *Arntl2* (F- CACTTAATCCTCAAGGCTAGTTT; R- ATGAACTCAGCCGGTCTCAC), *Per2* (F- TTCTGGTCTGGACTGCACAT; R- AGAAGGAGGTTGAGCAGGTC), *Cry2* (F- GTCCTGCAGTGCTTTCTTCC; R- GGCATTCCAGGGCTCATAGA), *Pck1* (F- AATGATGACCGTCTTGCTTTTCG; R- TGGTCTGGACTTCTCTGCCAAG), *Slc2a2* (F- TTTTCAGCCAAGGACCCCGT; R- GCCCAAGGAAGTCCGCAATG), *Akt1* (F- CCGGTTCTTTGCCAACATCG; R- ACACACTCCATGCTGTCATCTT), *Akt2* (F- TTCTACAACCAGGACCACGAGC; R- TGATGCTGAGGAAGAACCGATG), *Tnf* (F- GACAAGCCTGTAGCCCATGT; R- GTTGCCAGCACTTCACTGTG) e *Ppargc1a* (F- GAAGACATTCCATTACAAGAGCTGACC; R- GCCTGTTGTAGAGCTGGGTCTT).

Análises estatísticas: As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, EUA). A simetria dos dados foi confirmada por testes de normalidade, sendo eles Anderson-Darling, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e D'Agostino e Pearson. Foi considerado simétrico se aprovado por ao menos 2 dos testes. Após avaliação da homoscedasticidade pelo teste de 'F' foi aplicado o Teste *t* de 'Student' não pareado e considerado efeito significativo quando alcançado o valor de $p < 0,05$. Nas análises longitudinais foi realizada comparação em cada 'endpoint' da abcissa, comparando os grupos entre si. Análises não-paramétricas foram aplicadas nos casos de confirmação de assimetria e/ou heterocedasticidade e neste caso o teste utilizado será o Mann-Whitney. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalos interquartis quando paramétricos ou não-paramétricos, respectivamente.

4 RESULTADOS

O protocolo de perturbação do sono alterou a variação da massa corporal inicial e final de machos e fêmeas: Os pesos corpóreos foram similares entre grupos controle e perturbação de sono antes do início do protocolo experimental e permaneceram sem diferenças significativas ao longo do protocolo em ambos os sexos (**Figs. 4a e b**). Contudo, a análise da variação de peso corpóreo entre os dias -1 e 5, revelou menor ganho de peso nos grupos MPS (**Fig. 5a**) e FPS (**Fig. 5b**). A variação de peso corpóreo entre os dias -1 e 25 também manteve esse perfil de resposta nos grupos MPS (**Fig. 5c**) e FPS (**Fig. 5d**).

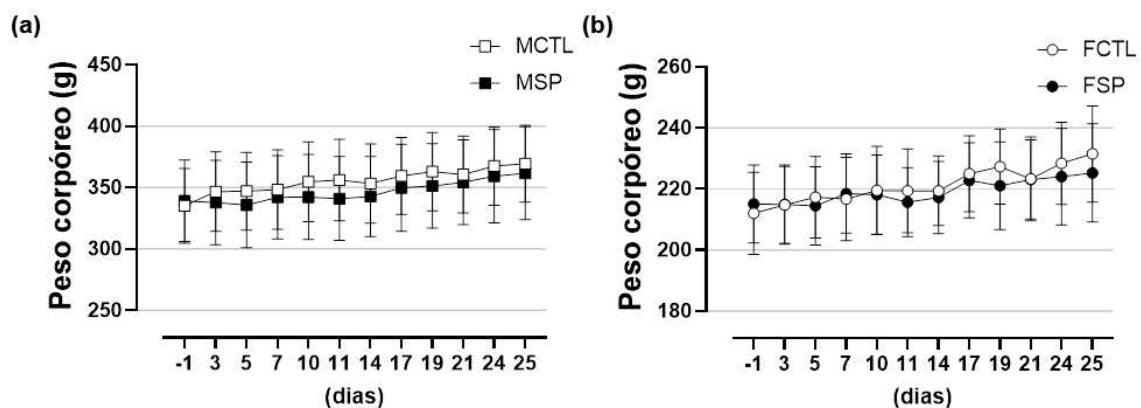


Figura 4. A perturbação de sono não alterou significativamente os pesos corpóreos ao longo do protocolo. Gráfico à esquerda (**Fig. 4a**) se refere evolução do peso corpóreo durante o tratamento nos grupos de Machos e (**Fig. 4b**) nos grupos de fêmeas. N=10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita em cada 'endpoint' da abcissa utilizando Teste *t* de Student não pareado. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$.

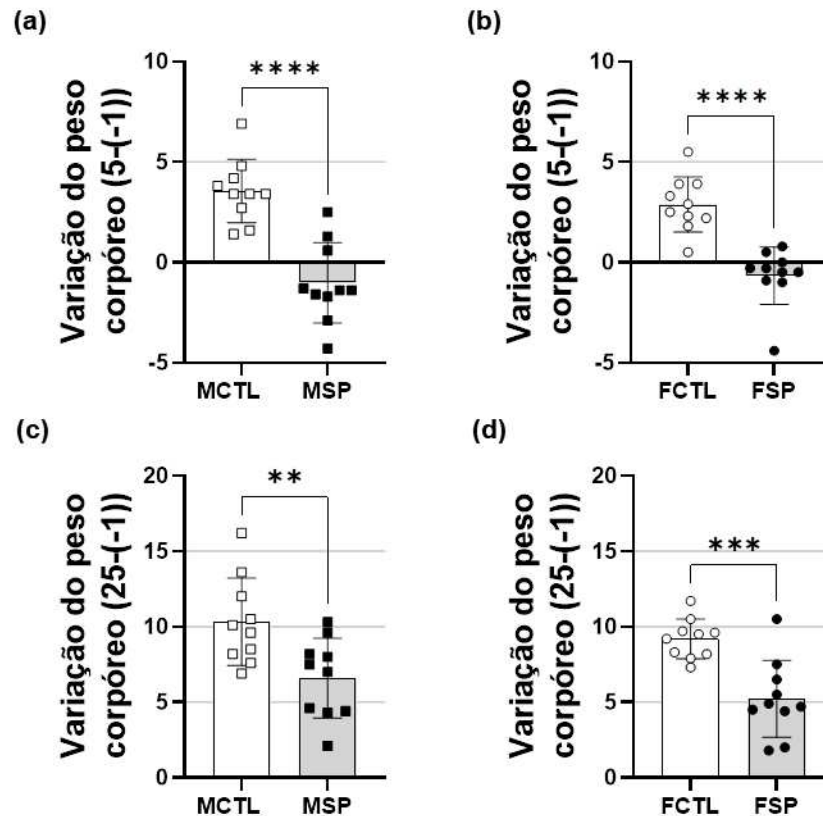


Figura 5. A perturbação de sono causa alteração na variação do peso corpóreo. Gráfico (**Fig. 5a**) se refere a variação de peso corpóreo em gramas nos grupos de Machos entre os dias -1 e 5 e gráfico (**Fig. 5b**) nos grupos de Fêmeas. Gráfico (**Fig. 5c**) se refere a variação do peso corpóreo em gramas nos grupos de Machos entre os dias -1 e 25 e (**Fig. 5d**) nos grupos de Fêmeas. N=10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão (a, c, d) ou mediana e intervalo interquartil (b). A análise foi feita utilizando Teste *t* de Student (dados paramétricos/homocedásticos) ou Mann-Whitney (dados não paramétricos/heterocedásticos). * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$.

O protocolo de perturbação de sono alterou o comportamento ingestivo de machos e fêmeas: o protocolo de perturbação de sono resultou em menor ingestão alimentar no dia 3 no grupo FPS em relação ao grupo FCTL (**Fig. 6b**) e maior consumo alimentar nos dias referentes ao período de descanso, sendo significativo nos dias 14 e 21 para machos (**Fig. 6a**) e dias 7 e 21 para fêmeas (**Fig. 6b**). Ainda, os animais machos tiveram maior ingestão alimentar na última semana de tratamento, observado nos dias 23 e 25 (**Fig. 6a**). Não houve diferença nos valores quando analisados de forma geral, ou seja, por meio da área-abaxio-da-curva (AUC) (**Fig. 7a e b**).

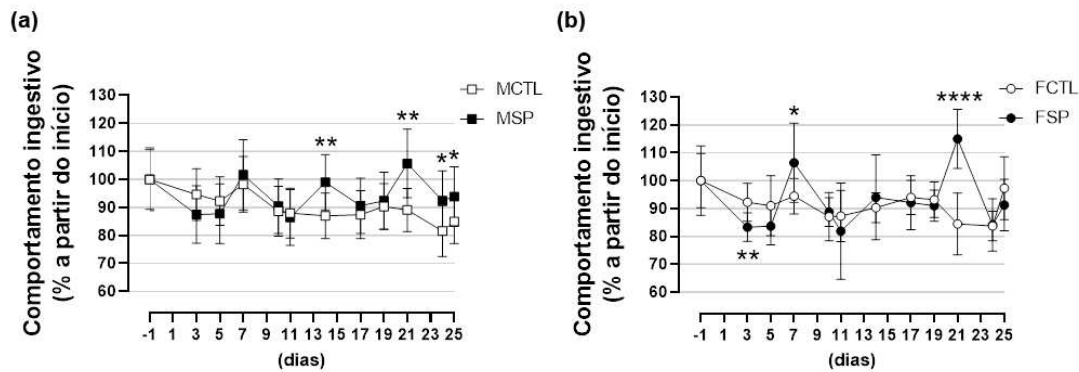


Figura 6. A perturbação de sono afeta a ingestão alimentar de ratos e ratas. Gráfico à esquerda (**Fig. 6a**) se refere a quantificação da ingestão alimentar durante o protocolo nos machos enquanto o gráfico à direita (**Fig. 6b**) mostra os dados nas fêmeas. N=10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados foram normalizados a partir da obtenção dos valores em g por 100g de peso corpóreo ingeridas no dia '-1'. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita em cada 'endpoint' da abscissa utilizando Teste *t* de Student não pareado. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$.

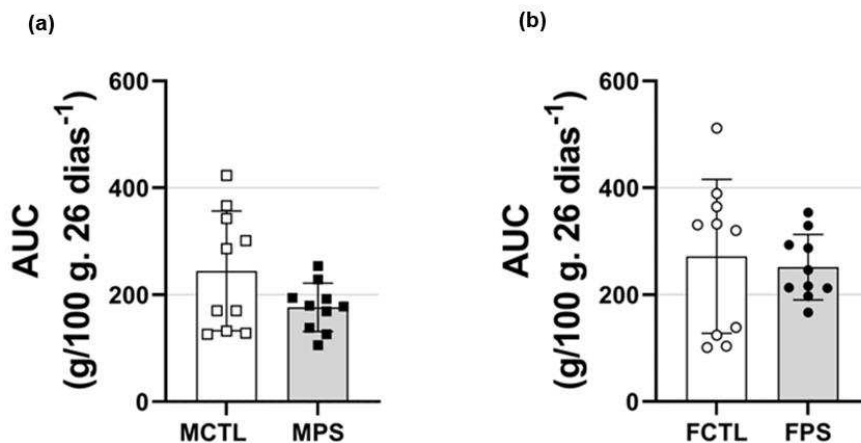


Figura 7. AUC ($\text{g}/100\text{g} \cdot 26\text{dias}^{-1}$). Gráfico (**Fig. 7a**) se refere à área abaixo da curva de comportamento ingestivo dos grupos de machos e (**Fig. 7b**) dos grupos de fêmeas. N=10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados foram normalizados a partir do valor basal. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando Teste *t* de Student não pareado. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$.

O protocolo de perturbação do sono não alterou o comportamento de machos e fêmeas: A performance de machos e fêmeas durante o teste de campo aberto para avaliação do comportamento tipo ansioso foi similar entre os grupos controle e perturbação de sono. Não houve diferença no número total de cruzamentos nos quadrantes entre os grupos de machos (**Fig. 8a**) e de fêmeas (**Fig. 8c**). Não houve diferença na porcentagem de cruzamentos nos

quadrantes centrais do campo entre os grupos de machos (**Fig. 8b**) e de fêmeas (**Fig. 8d**).

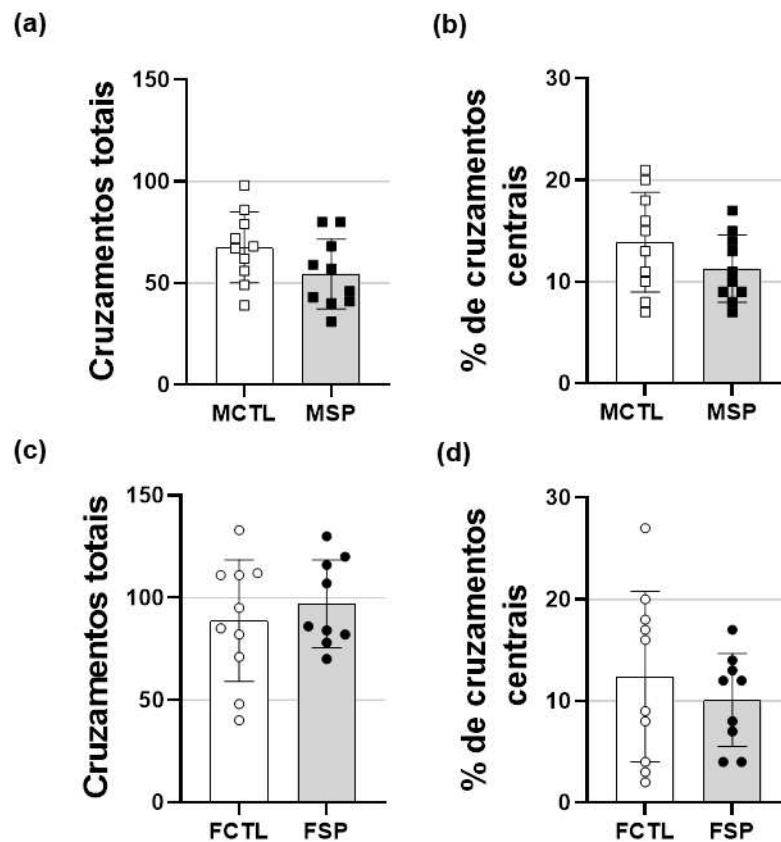


Figura 8. A perturbação do sono não alterou o desempenho durante o teste de Campo Aberto. Gráfico (**Fig. 8a**) se refere ao número total de cruzamentos entre os quadrantes dos grupos de machos e (**Fig. 8c**) dos grupos de fêmeas. Gráfico (**Fig. 8b**) se refere a porcentagem dos cruzamentos nos quadrantes centrais do campo dos grupos de machos e (**Fig. 8d**) dos grupos de fêmeas. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando Teste *t* de Student não pareado. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$. Uma fêmea foi perdida no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação do sono não alterou a consolidação da memória de machos e fêmeas: A performance de machos e fêmeas durante o teste de esquia inibitória para avaliação de consolidação de memória de curto e longo prazo foi similar entre os grupos controle e perturbação de sono. Houve diferença significativa entre o período de treino e testes de 1h e 24h em todos os grupos, indicando que todos consolidaram a memória aversiva. Não houve diferenças significativas entre grupos controle e perturbação de sono de machos (**Fig. 9a**) e de fêmeas (**Fig 9b**).

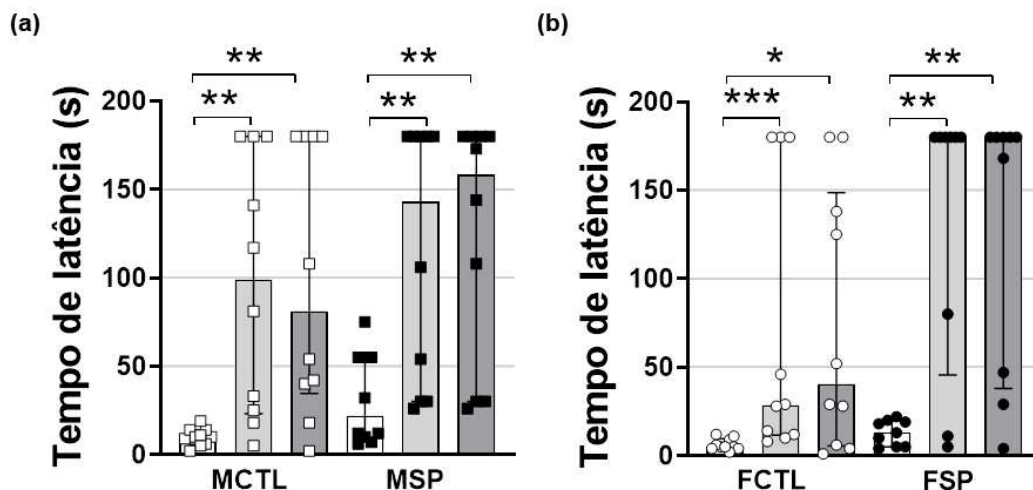


Figura 9. A perturbação do sono não alterou o desempenho durante o teste de Esquiva Inibitória. Gráfico (**Fig. 9a**) se refere ao tempo em segundos de latência para descida da plataforma na sessão treino, teste 1.5 h e teste 24 h (barras brancas, cinza claras e cinza escuras, respectivamente) dos grupos de machos e (**Fig. 9b**) dos grupos de fêmeas. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em mediana e intervalo interquartil. A análise foi feita utilizando Mann-Whitney. *P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, **** P<0,0001. Uma fêmea foi perdida no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação do sono diminuiu a tolerância à glicose em machos e fêmeas durante o tratamento: Os valores de glicemia basal foram similares entre os grupos de machos e fêmeas. No teste de tolerância à glicose intraperitoneal referente à segunda semana de tratamento, não foram observadas diferenças na tolerância à glicose nos machos do grupo MSP (**Fig. 10a**) enquanto para fêmeas, o grupo que passou pelo protocolo de perturbação do sono (FPS) apresentou menor tolerância à glicose como pode ser observado no minuto 30 (**Fig. 10b**). No teste de tolerância à glicose referente à quarta semana de tratamento, machos que passaram pelo protocolo de perturbação de sono (MPS) tiveram menor tolerância à glicose, como pode ser observado no minuto 30 (**Fig. 10c**) enquanto as fêmeas submetidas a perturbação do sono recuperaram a tolerância à glicose (**Fig. 10d**). Os valores de área abaixo da curva (AUC), calculada a partir de valores normalizados pela glicemia basal, foi maior no grupo FPS em relação do grupo FCTL (**Fig. 11b**) e não foram observadas alterações significativas entre os machos (**Fig. 11a**) na segunda semana. Os valores de AUC da quarta semana foram maiores no grupo MPS em relação do grupo MCTL (**Fig. 11c**) e não foram observadas alterações significativas entre as fêmeas (**Fig. 11d**).

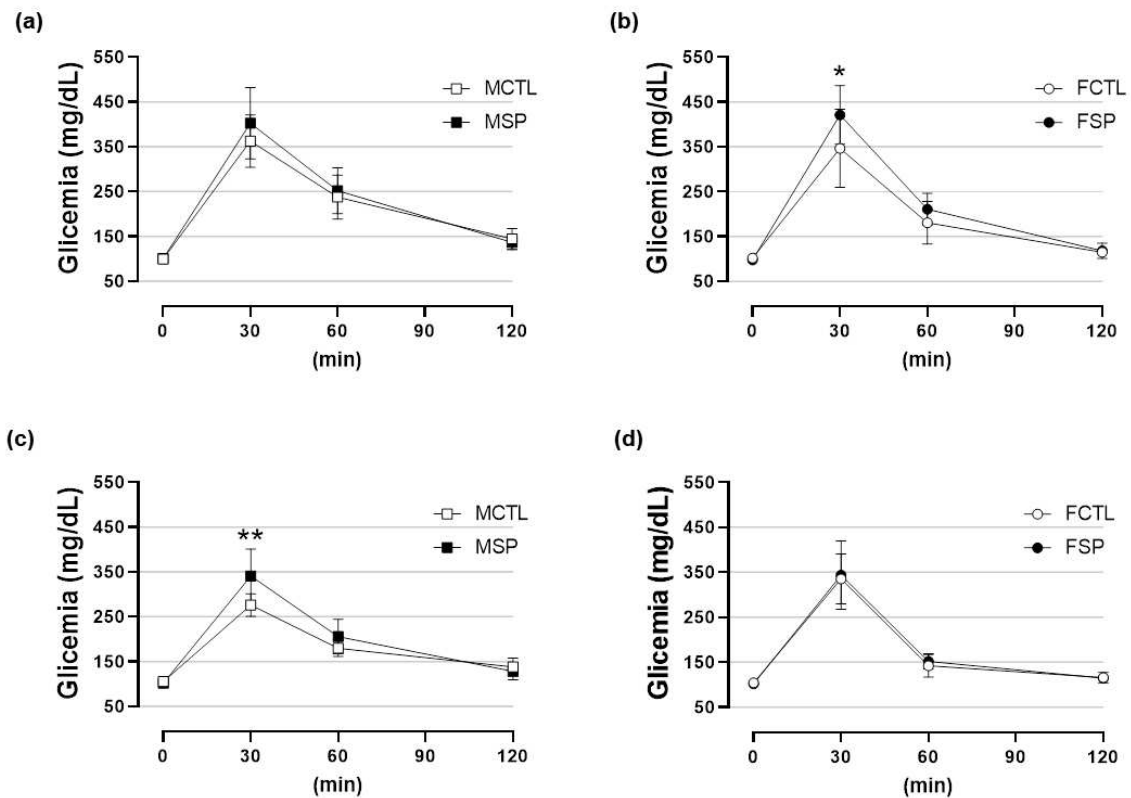


Figura 10. A perturbação de sono impactou a tolerância à glicose em machos e fêmeas. Gráfico (**Fig. 10a**) se refere a glicemia durante o Teste de Tolerância a Glicose intraperitoneal na segunda semana de tratamento dos grupos de machos e (**Fig. 10b**) dos grupos de fêmeas. Gráfico (**Fig. 10c**) se refere a glicemia durante o Teste de Tolerância a Glicose intraperitoneal na quarta semana de tratamento dos grupos de machos e (**Fig. 10d**) dos grupos de fêmeas. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FSP- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita em cada 'endpoint' da abscissa utilizando Teste *t* de Student não pareado. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$. Uma fêmea foi perdida no decorrer do protocolo.

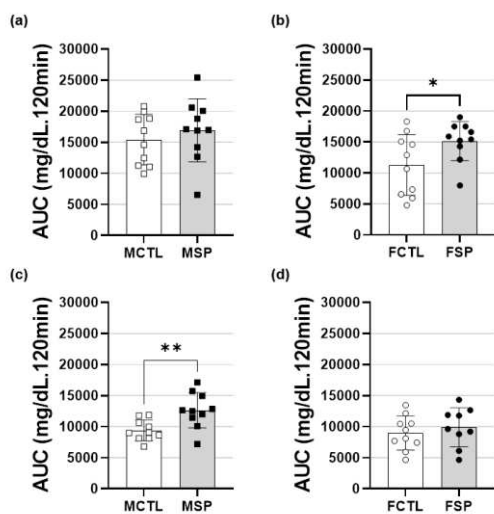


Figura 11. Área abaixo da curva glicêmica. Gráfico (**Fig. 11a**) se refere à durante o Teste de Tolerância a Glicose da segunda semana dos grupos de machos e (**Fig. 11b**) dos grupos de fêmeas. Gráfico (**Fig. 11c**) se refere à área abaixo da curva durante o Teste de Tolerância a Glicose da quarta semana dos grupos de machos e (**Fig. 11d**) dos grupos de fêmeas. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FSP- fêmeas perturbação de sono. Os dados foram normalizados a partir do valor de partida. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando Teste *t* de Student não pareado. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$. Uma fêmea foi perdida no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação do sono aumentou a sensibilidade à insulina em machos, mas não em fêmeas, após 4 semanas de tratamento: Os valores de glicemia basal foram similares entre os grupos de machos e fêmeas. A resposta durante o teste de tolerância à insulina da segunda semana foi similar entre os grupos de machos (**Fig. 12a**) e fêmeas (**Fig. 12b**). A resposta durante o teste de tolerância à insulina da quarta semana foi maior no grupo de machos que passaram pelo protocolo de perturbação de sono (MPS) como pode ser observado no minuto 40 (**Fig. 12c**) e não foram observadas alterações nas fêmeas (**Fig. 12d**). Os valores da constante de decaimento da glicemia durante o teste de tolerância à insulina (K_{ITT}) foram similares entre os grupos na segunda semana de tratamento (**Fig. 13a e b**). Os valores de K_{ITT} da quarta semana foram maiores no grupo MPS em relação do grupo MCTL (**Fig. 13c**) e não foram observadas alterações significativas entre as fêmeas (**Fig. 13d**).

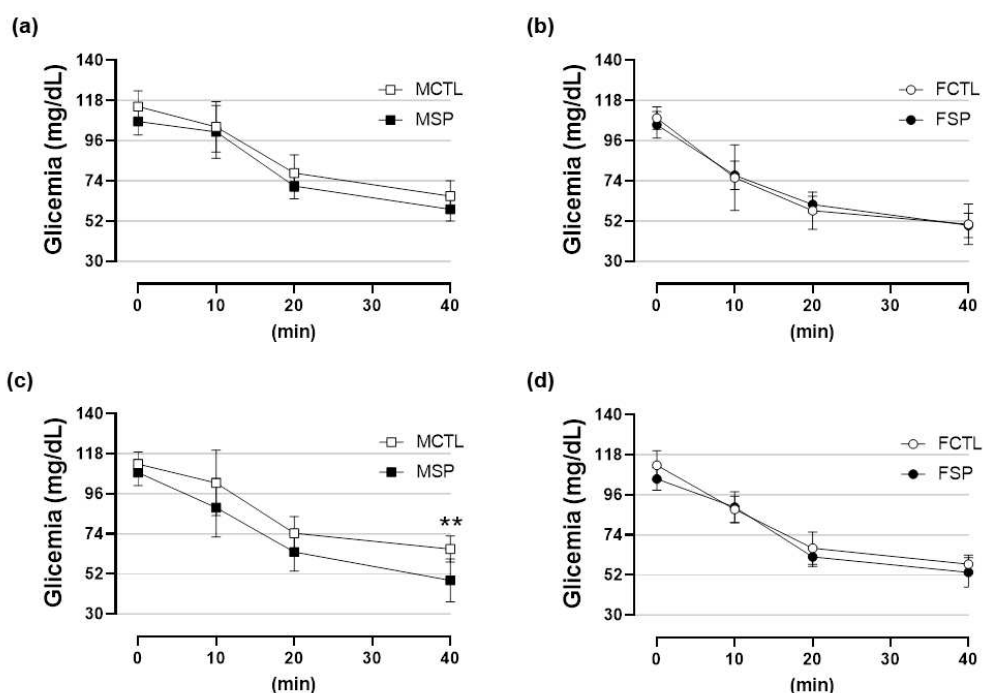


Figura 12. A perturbação de sono impactou a sensibilidade à insulina em machos, mas não em fêmeas, após 4 semanas de tratamento. Gráfico (**Fig. 12a**) se refere a glicemia durante o Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal na segunda semana de tratamento dos grupos de machos e (**Fig. 12b**) dos grupos de fêmeas. Gráfico (**Fig. 12c**) se refere a glicemia durante o Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal na quarta semana de tratamento dos grupos de machos e (**Fig. 12d**) dos grupos de fêmeas. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita em cada 'endpoint' da abcissa utilizando Teste t de Student não pareado. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$. Uma fêmea e um macho foram perdidos no decorrer do protocolo.

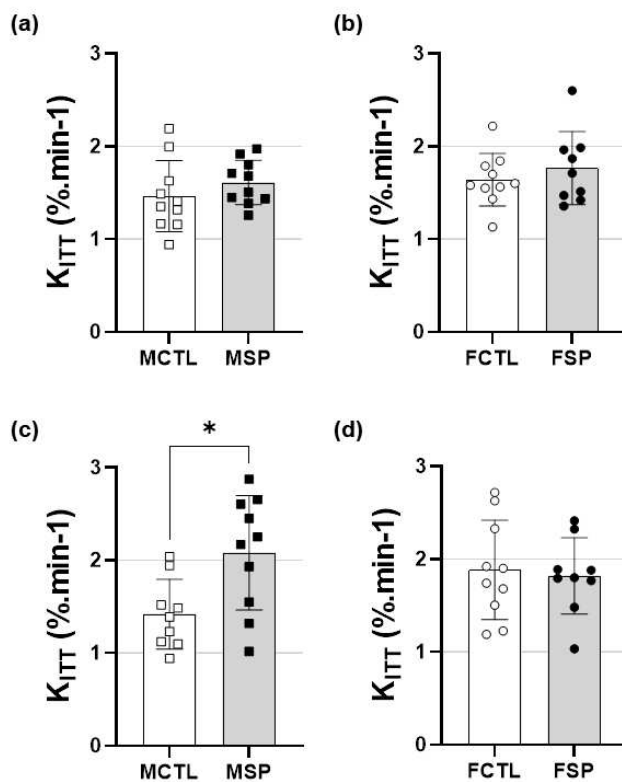


Figura 13. K_{ITT} ($\% \cdot \text{min}^{-1}$). Gráfico (Fig. 13a) se refere à constante de decaimento da glicemia durante o Teste de Tolerância à Insulina da segunda semana dos grupos de machos e (Fig. 13b) dos grupos de fêmeas. Gráfico (Fig. 13c) se refere à constante de decaimento da glicemia durante o Teste de Tolerância à Insulina da quarta semana dos grupos de machos e (Fig. 13d) dos grupos de fêmeas. $N=9-10$ para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados foram normalizados a partir do valor de partida. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando Teste t de Student não pareado. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$. Uma fêmea e um macho foram perdidos no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação de sono reduziu valores de colesterol total e aumentou os valores de corticosterona plasmática em machos, mas não alterou parâmetros plasmáticos de fêmeas: Os valores de insulina plasmática se mantiveram inalterados entre os grupos de machos (Fig. 14a) e fêmeas (Fig. 14e) após submissão ao protocolo experimental de perturbação do sono, assim como os valores de triacilglicerídeos plasmáticos em machos (Fig. 14c) e fêmeas (Fig. 14g). Valores de colesterol total plasmático foram menores em machos submetidos à perturbação de sono (Fig. 14b) e foram similares entre os grupos de fêmeas (Fig. 14f). Valores de corticosterona plasmática foram maiores em machos submetidos à perturbação de sono (Fig. 14d) e foram similares entre os grupos de fêmeas (Fig. 14h).

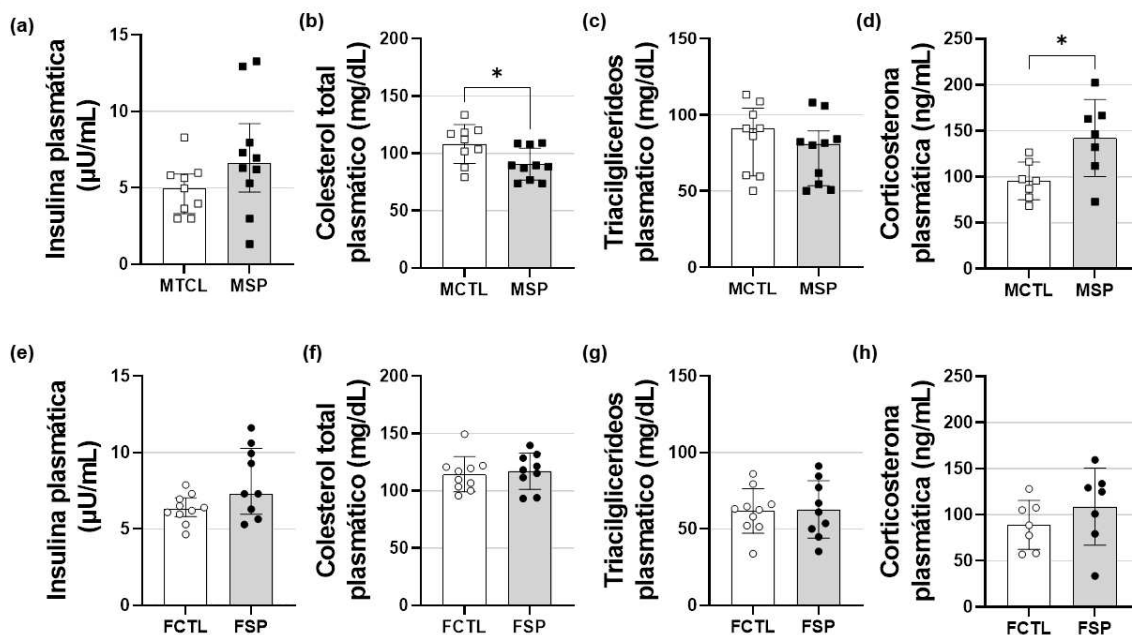


Figura 14. A perturbação de sono reduz valores de colesterol total plasmático e aumenta a corticosteronemia. Gráfico (Fig. 14a) se refere a valores de insulina plasmática em $\mu\text{U/mL}$ dos grupos de machos e (Fig. 14e) dos grupos de fêmeas. Gráfico (Fig. 14b) se refere a valores de colesterol total plasmático em mg/dL dos grupos de machos e (Fig. 14f) dos grupos de fêmeas. Gráfico (Fig. 14c) se refere a valores de triacilglicerídeos plasmáticos em mg/dL dos grupos de machos e (Fig. 14g) dos grupos de fêmeas. Gráfico (Fig. 14d) se refere a valores de corticosterona plasmática em ng/mL dos grupos de machos e (Fig. 14h) de fêmeas. $N=9-10$ para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em mediana e intervalo interquartil para (Fig. 14a, c, e) e média \pm desvio padrão para (Fig. 14b, d, f, g, h). A análise foi feita utilizando Mann-Whitney (Fig. 14a, c, e) e Teste t de Student não pareado (Fig. 14b, d, f, g, h). * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$. Uma fêmea e um macho foram perdidos no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação de sono causou diminuição da adiposidade visceral de machos e fêmeas: A soma dos depósitos de gordura visceral (gorduras perigonadal, retroperitoneal e omental) foi menor nos ratos (Fig. 15d) e ratas (Fig. 15h) submetidos ao protocolo de perturbação de sono. Machos MPS apresentaram menores depósitos de gordura retroperitoneal (Fig. 15b) e omental (Fig. 15c), enquanto fêmeas FPS apresentaram menores depósitos de gorduras perigonadal (Fig. 15e) e retroperitoneal (Fig. 15f).

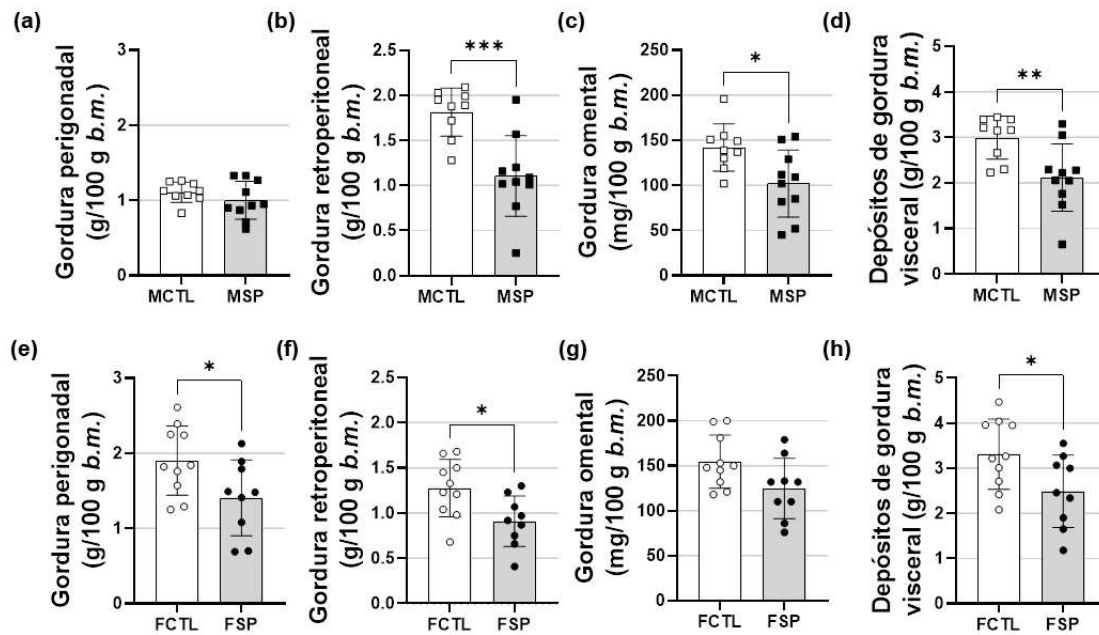


Figura 15. A perturbação de sono causa diminuição dos depósitos de adiposidade visceral de machos e fêmeas. Gráfico (**Fig. 15a**) se refere a massa de gordura perigonadal em gramas dos grupos de machos e (**Fig. 15e**) dos grupos de fêmeas. Gráfico (**Fig. 15b**) se refere a massa de gordura retroperitoneal em gramas dos grupos de machos e (**Fig. 15f**) dos grupos de fêmeas. Gráfico (**Fig. 15c**) se refere a massa de gordura omental em miligramas dos grupos de machos e (**Fig. 15g**) dos grupos de fêmeas. Gráfico (**Fig. 15d**) se refere a soma dos valores de depósitos de gordura visceral em gramas dos grupos de machos e (**Fig. 15h**) dos grupos de fêmeas. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados foram normalizados pelo peso do animal *100. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando Teste t de Student não pareado. *P \leq 0,05, ** P \leq 0,01, *** P \leq 0,001, **** P \leq 0,0001. Uma fêmea e um macho foram perdidos no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação de sono não alterou a massa de órgãos metabólicos em ambos os sexos: Não se observou alteração na massa do coração (**Fig. 16a e e**), pâncreas (**Fig. 16b e f**), glândulas adrenais (**Fig. 16c e g**) e baço (**Fig. 16d e h**) entre os grupos.

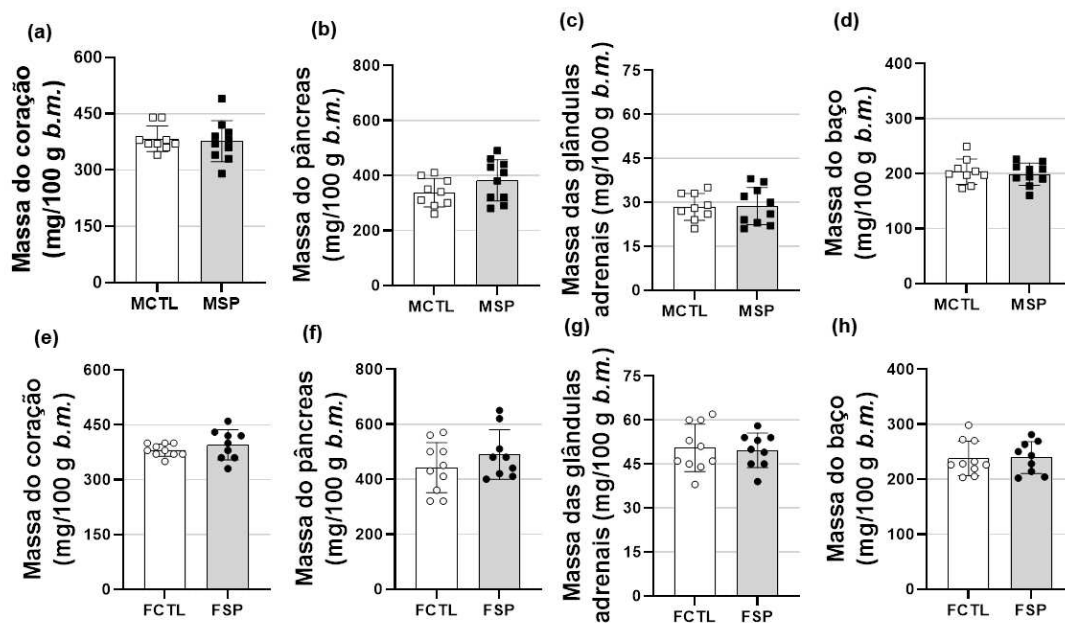


Figura 16. A perturbação de sono não altera a massa de órgãos metabólicos. Gráfico (**Fig. 16a**) se refere a massa do coração em miligramas dos grupos de machos e (**Fig. 16e**) dos grupos de fêmeas. Gráfico (**Fig. 16b**) se refere a massa do pâncreas em miligramas dos grupos de machos e (**Fig. 16f**) dos grupos de fêmeas. Gráfico (**Fig. 16c**) se refere a massa das adrenais em miligramas dos grupos de machos e (**Fig. 16g**) dos grupos de fêmeas. Gráfico (**Fig. 16d**) se refere a massa do baço em miligramas dos grupos de machos e (**Fig. 16h**) dos grupos de fêmeas. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados foram normalizados pelo peso do animal *100. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando Teste t de Student não pareado. *P \leq 0,05, ** P \leq 0,01, *** P \leq 0,001, **** P \leq 0,0001. Uma fêmea e um macho foram perdidos no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação de sono reduziu o tamanho dos adipócitos viscerais em machos e em fêmeas: Se observou diminuição da área e do perímetro dos adipócitos e o aumento do número de células contadas por campo em machos (**Fig. 17a, b e c**) e em fêmeas (**Fig. 17f, g e h**). Também se observou alteração na distribuição do tamanho dos adipócitos de tecido visceral em machos (**Fig. 17d**) e em fêmeas (**Fig. 17i**). As **Figuras 17e e j** mostram imagens representativas do tecido adiposo visceral de machos e fêmeas, respectivamente, corados com Tricrômico de Gomori para evidenciar a diminuição da área das células nos grupos submetidos à privação de sono.

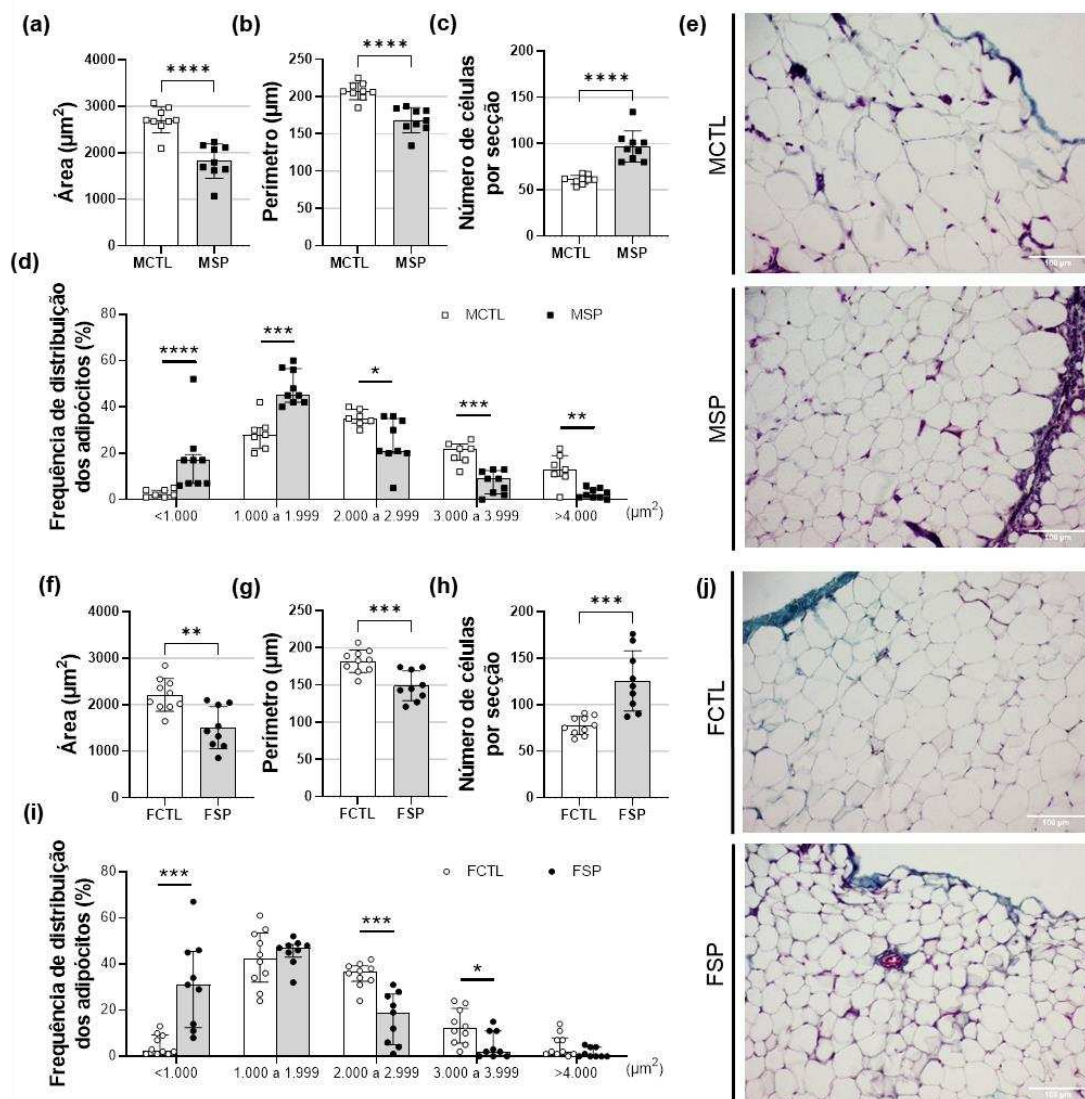


Figura 17. A perturbação de sono altera parâmetros morfométricos do tecido adiposo visceral de machos e fêmeas. Gráfico (Fig. 17a) se refere a área em μm^2 dos adipócitos de machos e gráfico (Fig. 17f) em fêmeas. Gráfico (Fig. 17b) se refere ao perímetro em μm dos adipócitos de machos e gráfico (Fig. 17g) em fêmeas. Gráfico (Fig. 17c) se refere ao número de células contadas por campo em machos e gráficos (Fig. 17h) em fêmeas. Gráfico (Fig. 17d) se refere a distribuição da frequência em porcentagem do tamanho da área em micrômetros dos adipócitos dos grupos de machos e gráfico (Fig. 17i) de fêmeas. Fig. 17e se refere às imagens representativas da histologia de tecido adiposo de machos e Fig. 17j de fêmeas, coradas com Tricrômico de Gomori. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FSP- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando Teste t de Student não pareado. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$. Uma fêmea e um macho foram perdidos no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação de sono não afetou a massa do pâncreas endócrino em machos e em fêmeas: Não se observou alteração na massa absoluta de ilhotas pancreáticas em machos (Fig. 18a) e em fêmeas (Fig.

18d). Também não se observou diferença na massa de ilhotas pancreáticas quando normalizadas pelo peso corpóreo do animal em machos (**Fig. 18b**) e em fêmeas (**Fig. 18e**). As **Figuras 18c e 18f** mostram imagens representativas de pâncreas de machos e fêmeas, respectivamente, corados com Tricrômico de Gomori para demonstrar a similaridade de tamanho das ilhotas pancreáticas nos grupos controle e perturbação de sono.

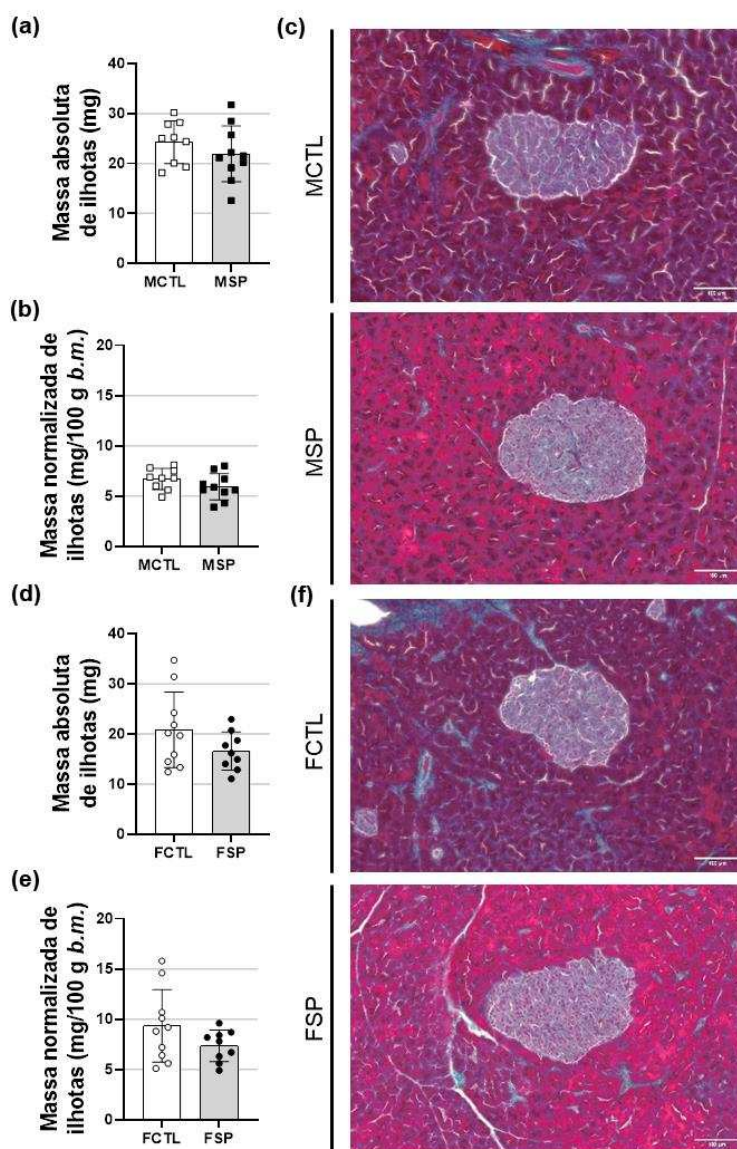


Figura 18. A perturbação de sono não altera parâmetros morfométricos do pâncreas endócrino de machos e fêmeas. Gráfico (**Fig. 18a**) se refere a massa absoluta de ilhotas pancreáticas em mg dos grupos de machos e gráfico (**Fig. 18d**) de fêmeas. Gráfico (**Fig. 18b**) se refere a massa ilhotas pancreáticas em mg normalizadas pelo peso corpóreo do animal dos grupos de machos e gráfico (**Fig. 18e**) de fêmeas. **Fig. 18c** se refere às imagens representativas da histologia de pâncreas de machos e **Fig. 18f** de fêmeas coradas com Tricrômico de Gomori. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando Teste t de Student não pareado. Uma fêmea e um macho foram perdidos no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação de sono não alterou a distribuição de células beta e alfa nas ilhotas pancreáticas em machos e em fêmeas: Não se observou alteração na porcentagem de células beta nas ilhotas pancreáticas em machos (**Fig. 19a**) e em fêmeas (**Fig. 19d**). Também não se observou diferença na porcentagem de células alfa nas ilhotas pancreáticas em machos (**Fig. 19b**) e em fêmeas (**Fig. 19e**). A **Figura 19c** mostra imagens representativas de pâncreas imunomarcadas para insulina e para glucagon em machos e **Figura 19f** em fêmeas, para demonstrar a similaridade de distribuição das células nas ilhotas pancreáticas nos grupos controle e perturbação de sono.

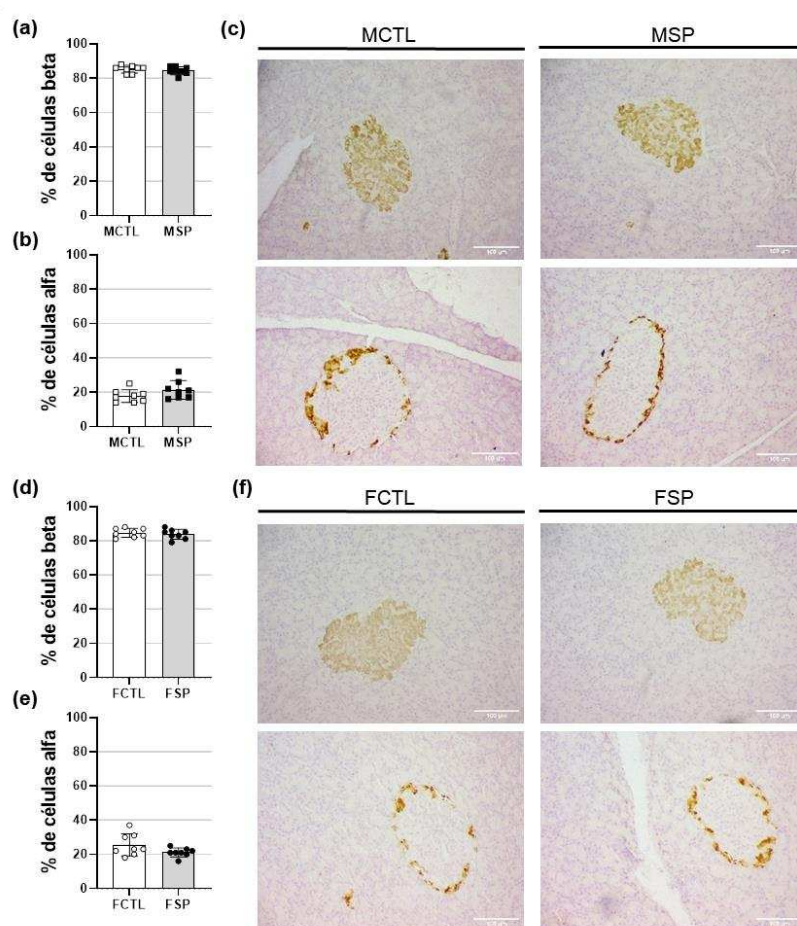


Figura 19. A perturbação de sono não altera a distribuição de células beta e alfa nas ilhotas pancreáticas em machos e em fêmea. Gráfico (**Fig. 19a**) se refere a porcentagem de células beta nas ilhotas pancreáticas dos grupos de machos e gráfico (**Fig. 19d**) de fêmeas. Gráfico (**Fig. 19b**) se refere à porcentagem de células alfa nas ilhotas pancreáticas dos grupos de machos e gráfico (**Fig. 19e**) de fêmeas. **Fig. 19c** se refere às imagens representativas da histologia de pâncreas de machos imunomarcadas para insulina e para glucagon e **Fig. 19f** de fêmeas. N=8 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando Teste t de Student não pareado.

O protocolo de perturbação de sono não alterou a morfologia dos hepatócitos em machos e em fêmeas: Não se observou alteração no conteúdo de triacilglicerídeos hepáticos em machos (**Fig. 20a**) e em fêmeas (**Fig. 20c**). Também não se observou diferença na morfologia dos hepatócitos, assim como na deposição de glicogênio intracitoplasmático em machos (**Fig. 20b**) e em fêmeas (**Fig. 20d**). As **Figuras 20b e d** mostram imagens representativas de fígado corado com Ácido Periódico de Schiff, para demonstrar a similaridade de morfologia das células e padrão de deposição de glicogênio nos grupos controle e perturbação de sono.

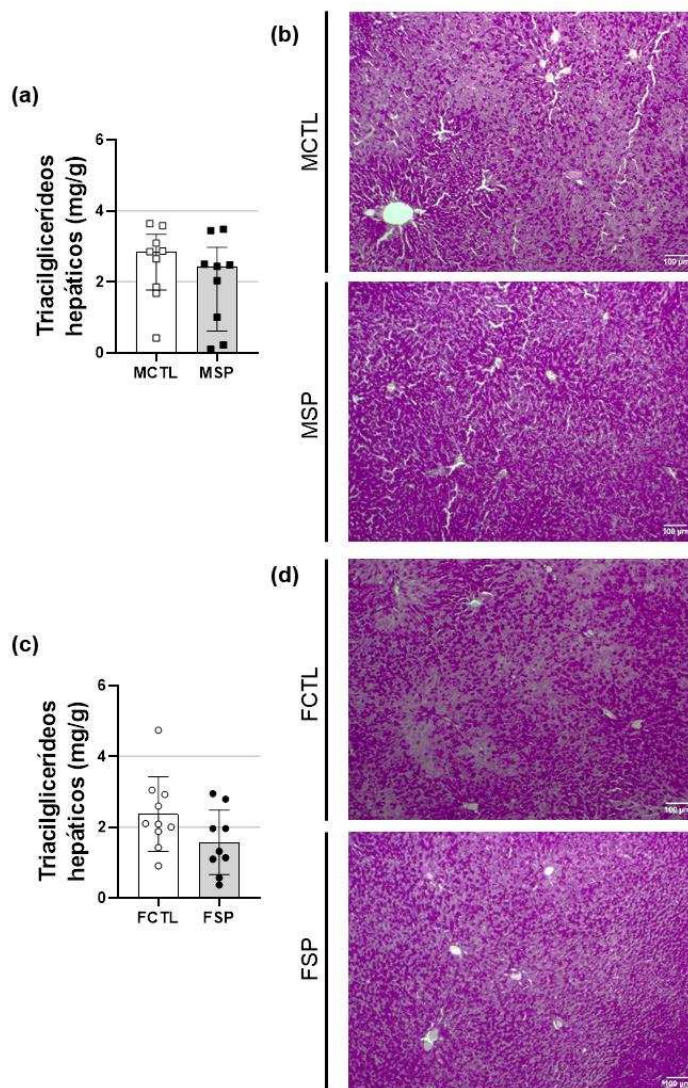


Figura 20. A perturbação de sono não altera a morfologia dos hepatócitos em machos e em fêmeas. Gráfico (**Fig. 20a**) se refere ao conteúdo de triacilglicerídeos hepáticos em mg/g de tecido em machos e gráfico (**Fig. 20c**) em fêmeas. **Fig. 20b e d** se referem às imagens representativas da histologia de fígado de machos e fêmeas corados com Ácido Periódico de Schiff. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em mediana e intervalo interquartil. A análise foi feita utilizando Mann-Whitney. Uma fêmea e um macho foram perdidos no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação de sono não alterou parâmetros morfométricos das glândulas adrenais de machos e fêmeas: Não se observou alteração no diâmetro médio da glândula adrenal, no diâmetro médio da medula adrenal e na espessura do córtex adrenal de machos (**Fig. 21a, b e c**) e de fêmeas (**Fig. 21e, f e g**). A **Figura 21d** mostra imagens representativas de glândulas adrenais coradas com Tricrômico de Gomori de machos e **Figura 21h** de fêmeas, para demonstrar a similaridade tamanho da glândula nos grupos controle e perturbação de sono.

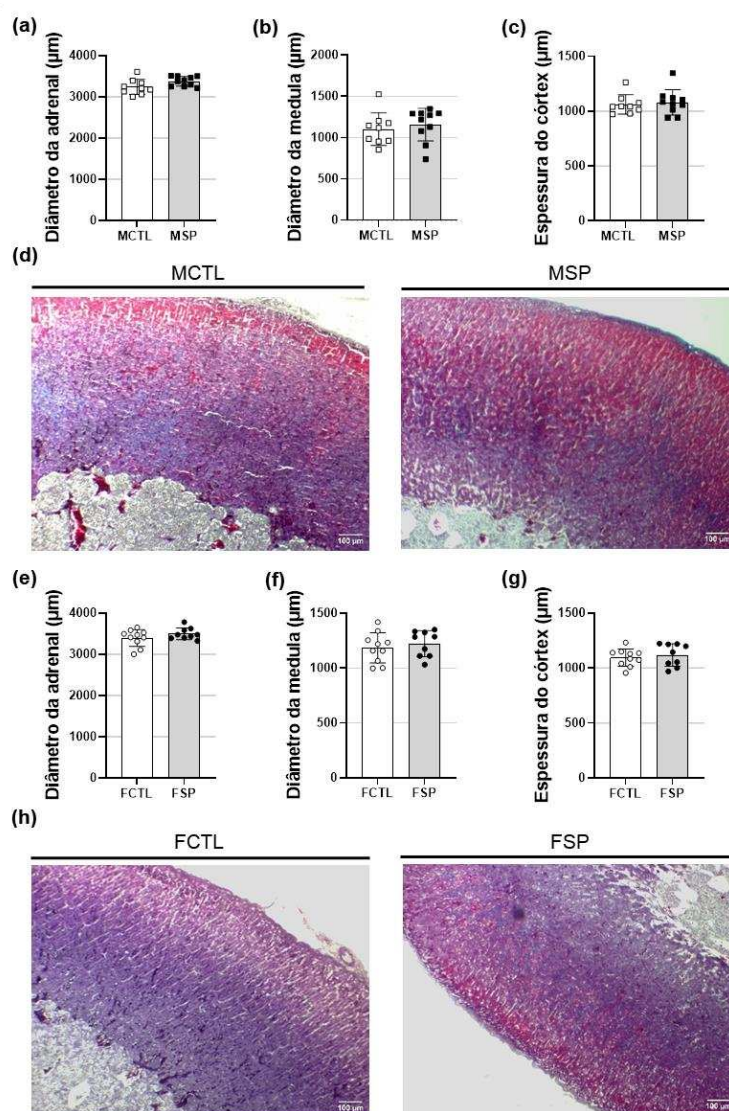


Figura 21. A perturbação de sono não altera parâmetros morfométricos das glândulas adrenais em machos e em fêmea. Gráfico (**Fig. 21a**) se refere ao diâmetro da glândula adrenal em µm dos grupos de machos e gráfico (**Fig. 21e**) de fêmeas. Gráfico (**Fig. 21b**) se refere ao diâmetro da medula adrenal em µm dos grupos de machos e gráfico (**Fig. 21f**) de fêmeas. Gráfico (**Fig. 21c**) se refere a espessura do córtex adrenal em µm dos grupos de machos e gráfico (**Fig. 21g**) de fêmeas. **Fig. 21d** se refere às imagens representativas da histologia de pâncreas de machos coradas com Tricrômico de Gomori e **Fig. 21h** de fêmeas. N=9-10 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono, FCTL- fêmeas controle e FPS- fêmeas perturbação de sono. Os dados são expressos em média \pm desvio padrão. A análise foi feita utilizando Teste t de Student não pareado. Uma fêmea e um macho foram perdidos no decorrer do protocolo.

O protocolo de perturbação de sono alterou a transcrição de genes Clock e metabólicos em ambos os sexos: Se observou diminuição na expressão de *Cry2* e *Slc2a2* e aumento de *Ppargc1a* em fígado de machos. Não se observou diferença na expressão de *Nr1d2*, *Arntl2*, *Per2*, *Pck1*, *Akt1*, *Akt2*, *Tnf* e *Scd1*

(Fig. 22a). Também não se observou diferença na expressão de nenhum dos genes analisados em fígado de fêmeas (Fig. 22b). Em músculo, não se observou alteração para grupos de machos (Fig. 23a) e se observou redução na expressão de *Per2* no grupo de fêmeas. Também não se observou diferença na expressão de *Nr1d2*, *Arntl2*, *Cry2*, *Akt1*, *Akt2* e *Ppargc1a* para fêmeas (Fig. 23b).

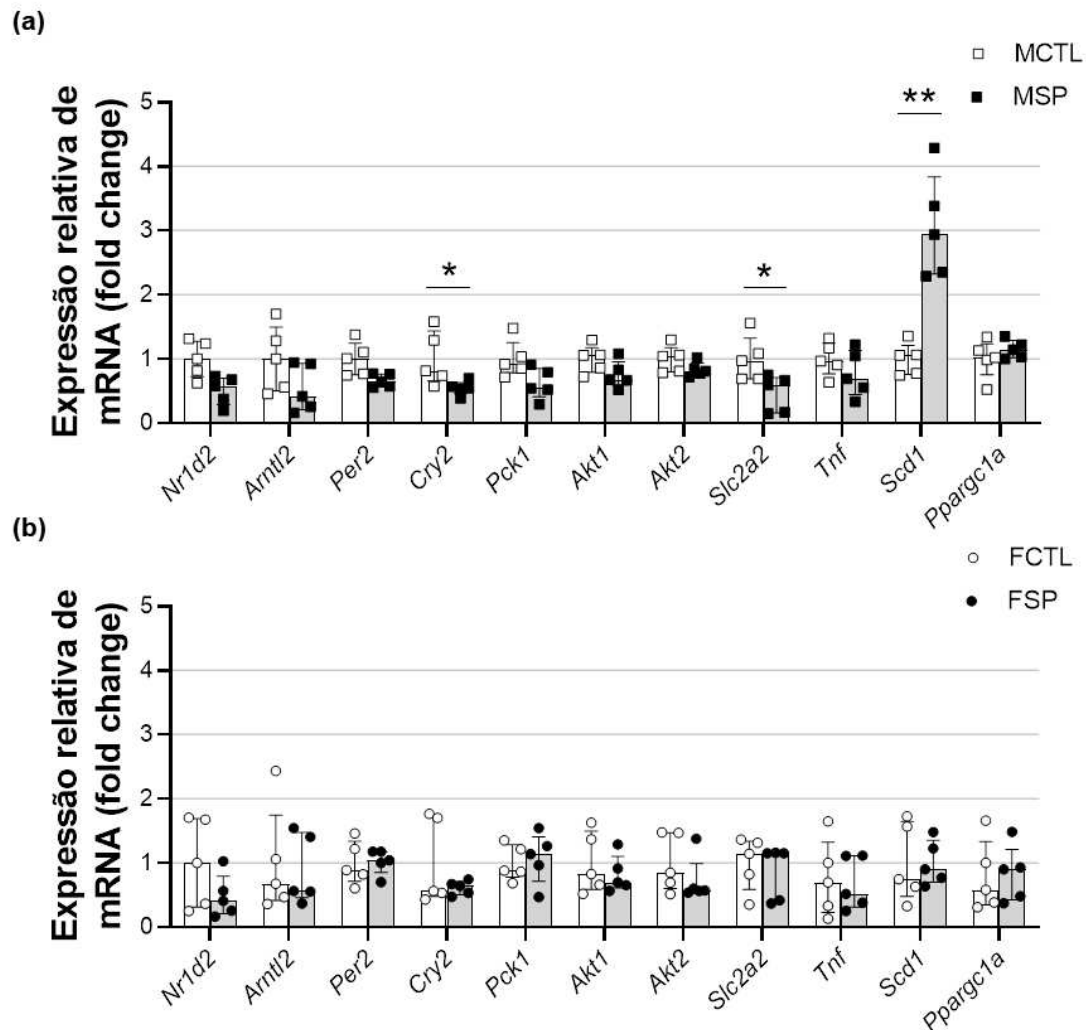


Figura 22. A perturbação de sono altera a expressão de gene *Clock* e metabólicos em fígado de machos. Gráfico (Fig. 22a) se refere a expressão relativa dos genes *Nr1d2*, *Arntl2*, *Per2*, *Cry2*, *Pck1*, *Akt1*, *Akt2*, *Slc2a2*, *Tnf*, *Scd1* e *Ppargc1a* no fígado de machos e gráfico (Fig. 22b) em fêmeas. N=5 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono. Os valores relativos expressos foram normalizados pelos valores expressos dos genes e amostras controle. Os dados são expressos em mediana e intervalo interquartil. A análise foi feita utilizando Mann-Whitney. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$.

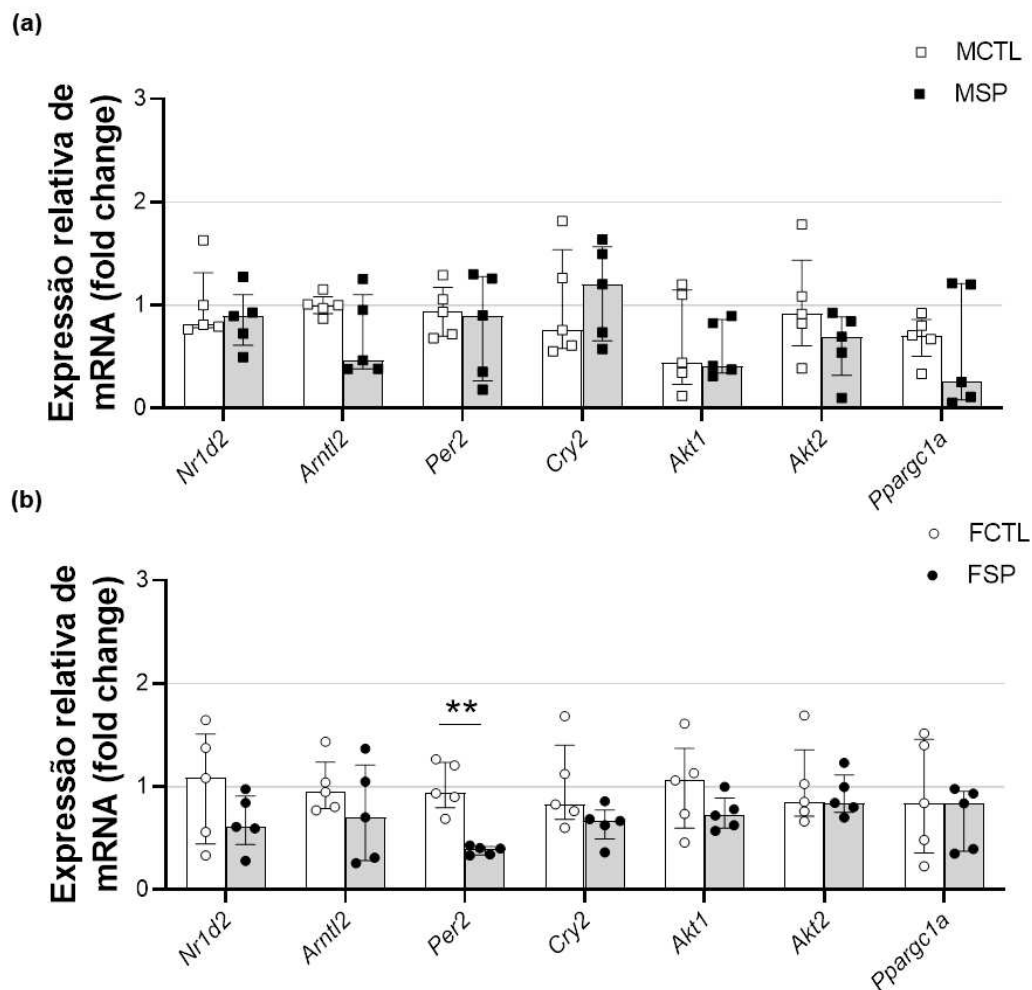


Figura 23. A perturbação de sono altera a expressão de gene *Clock* em músculo de fêmeas. Gráfico (Fig. 23a) se refere a expressão relativa dos genes *Nr1d2*, *Arntl2*, *Per2*, *Cry2*, *Akt1*, *Akt2*, e *Ppargc1a* no músculo de machos e gráfico (Fig. 23b) em fêmeas. N=5 para esta figura. Grupos experimentais: MCTL- machos controle, MPS- machos perturbação de sono. Os valores relativos expressos foram normalizados pelos valores expressos dos genes e amostras controle. Os dados são expressos em mediana e intervalo interquartil. A análise foi feita utilizando Mann-Whitney. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$.

5 DISCUSSÃO

Ritmos circadianos apresentam função importante na adaptabilidade dos processos fisiológicos e permitem ao organismo antecipar alterações rotineiras do ambiente. Porém, disrupções dos relógios biológicos podem levar a estados patológicos, envolvendo alteração no comportamento ingestivo, na secreção de insulina, na tolerância à glicose, no metabolismo lipídico, entre outros. Estas disrupções podem ser de origem genética ou comportamental, como restrição de sono, exposição noturna à luz e turnos de trabalho invertidos (Li et al., 2020; Guan; Lazar, 2021). Neste trabalho nós demonstramos que um protocolo de perturbação moderada e crônica de sono prejudica a tolerância à glicose de forma sexo-específica e reduz os depósitos de gordura visceral, independentemente do sexo. No entanto, não foram observadas alterações relevantes no componente ansiogênico, na consolidação da memória, e em parâmetros plasmáticos e morfológicos.

Com nosso protocolo, machos e fêmeas tiveram perda inicial de peso, seguida por um ganho menor em relação aos controles durante as quatro semanas de duração. Esta alteração foi associada, pós eutanásia, com menor deposição de gordura visceral, sem alteração nos valores de triacilglicerídeos plasmáticos. Em conjunto, estes resultados podem indicar um estado catabólico periférico e a necessidade de utilização dos substratos lipídicos gerados pela lipólise desse tecido como fonte de energia para as células através dos processos de β -oxidação. Diversos estudos associam privações prolongadas de sono a uma ativação do eixo HPA, pela quantificação de elevados níveis de adenocorticotropina (ACTH) e corticosterona (CORT) (Galvão et al., 2009; Hipólide et al., 2006; Suchecki et al., 2002;1998). Níveis elevados de CORT podem levar ao aumento da gliconeogênese hepática, aumentar os valores glicêmicos e promover um estado catabólico que intensifica a lipólise, gerando redução da massa adiposa (Sapolsky et al., 2000). Neste contexto, é possível esperar uma contribuição do sistema catecolaminérgico por meio da ativação simpatoadrenal. Um protocolo de privação de sono por múltiplas plataformas em ratos machos demonstrou elevação dos valores de dopamina e noradrenalina plasmática a partir de 24h de exposição (Andersen et al., 2005). Esta estimulação adrenérgica pode atuar

de forma sinérgica à CORT favorecendo o estado catabólico (Vaughan et al., 2014). Tal desfecho foi confirmado histologicamente com a diminuição da área e do perímetro dos adipócitos e um maior número de células por campo de análise.

Nossos resultados indicam uma redução do consumo alimentar como observado nos grupos experimentais nos dias de exposição ao protocolo de perturbação do sono. Este dado não corrobora o que se demonstra em estudos clínicos, onde a privação de sono em humanos é associada a um aumento do comportamento alimentar, como aumento de fome e consumo de alimentos mais palatáveis (Chaput et al., 2023). Entretanto, estudos com animais descrevem a existência de uma relação entre exposição ao estresse, ativação do eixo HPA, altos níveis de CORT e alteração da ingestão alimentar. Isto nos remete à dificuldade em diferenciar o que pode ser consequência da pior qualidade do sono ou ao estresse relacionado aos protocolos. Por exemplo, o estresse induzido por nado forçado por 15 minutos diários durante 3 dias resultou em redução da ingestão calórica e do peso corporal em ratos machos e fêmeas (Diane et al., 2008). Resultados semelhantes foram observados com a indução de estresse por restrição de movimento (2 horas diárias durante quatorze dias) já no primeiro dia e ao longo do protocolo (Martí et al., 1994). Por outro lado, durante os períodos de descanso encontramos maior ingestão alimentar dos nossos animais, provavelmente compensatória, mesmo que este comportamento não tenha se mostrado homogêneo durante todos os finais de semana. Isto poderia estar associado a processos hedônicos relacionados à cessação dos eventos estressores. Processos hedônicos são associados não apenas ao maior consumo, mas a uma preferência por alimentos de maior palatabilidade, como alimentos com maior teor de gordura (Maniam; Morris, 2012). Nós também observamos que os ratos machos do grupo MSP apresentaram maior consumo alimentar durante a última semana do protocolo, mesmo nos dias que estiveram expostos à perturbação de sono. Devido à perda significativa de tecido adiposo nestes animais, esta resposta poderia estar associada com uma menor secreção de leptina, como descrito por Galvão e colaboradores (2009). É possível que com a continuidade do protocolo este comportamento de maior ingestão pudesse resultar em ganho de peso nas

semanas seguintes, o que faria sentido considerando as observações clínicas. Este mesmo padrão foi observado anteriormente em roedores por meio da alteração do ciclo claro-escuro de 12h/12h para 10h/10h, onde os animais iniciaram a ganhar peso a partir da sexta semana, que se manteve até o final das dez semanas de protocolo (Karatsoreos et al., 2011).

Ativações do eixo HPA são ligadas a respostas negativas no comportamento tipo depressivo e ansioso em roedores (Kinlein et al., 2019). A administração oral de CORT leva a anedonia, falta de comportamentos de auto-cuidado e influencia diferentes alvos moleculares relativos ao estabelecimento de estresse (Gourley; Taylor, 2009). Contudo, os efeitos da privação de sono nestes parâmetros não são consistentes nos estudos pré-clínicos muito provavelmente por causar um fenótipo comportamental complexo, que não pode ser mensurado com aplicação de testes isolados. A ausência de alterações no comportamento dos animais durante o teste de campo aberto em nosso estudo corrobora outros estudos com animais envolvendo a privação de sono em que não foram capazes de identificar alterações comportamentais pelos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevada (Pires et al., 2016). Apesar de não observarmos efeitos ansiogênicos, é bem descrito a relação entre privação de sono e impactos negativos na consolidação da memória, especialmente quando estas envolvem a região do hipocampo (Havekes et al., 2012). Por exemplo, um protocolo de 6 horas de privação aguda de sono induziu prejuízos de memória espacial e reconhecimento de objetos (Raven et al., 2019) e outro com 21 dias de privação crônica de sono afetou a memória espacial de ratos (Konakanchi et al., 2022). Por outro lado, quando se trata de condicionamento por associação ao medo, parâmetros não diretamente dependentes de regiões do hipocampo, a privação de sono parece não apresentar efeitos (Graves, et al., 2003). Isto poderia explicar o motivo de não termos encontrado alterações na memória de curto e longo prazo entre os grupos, já que o teste utilizado de esquiva inibitória utiliza condicionamento com choque elétrico.

De acordo com o observado na literatura (Hipólide et al., 2006; Zhan et al., 2016; Jha et al., 2016), nossos animais machos se tornaram intolerantes à glicose durante a progressão do protocolo, que ocorreu com uma inesperada

maior sensibilidade à insulina. Esta intolerância à glicose ocorreu sem nenhuma alteração na massa ou na distribuição de células α e β nas ilhotas pancreáticas. Apesar de não termos medido a secreção de insulina in vivo, durante o GTT, é razoável assumirmos o impacto inibitório das catecolaminas e da corticosterona na resposta das ilhotas pancreáticas à glicose, já que estes experimentos se deram em dias regulares do protocolo de perturbação de sono (Nonogaki, 2000; Beaupere et al., 2021). Estes hormônios contrarreguladores também poderiam favorecer maior secreção de glucagon (Hamilton et al., 2018) e aumento da secreção hepática de glicose (Nonogaki, 2000), que explicariam a intolerância à glicose nos animais submetidos ao protocolo de perturbação o sono. Em concordância com essa suposição, um protocolo de privação de sono por 20 h diárias (usando o movimento forçado), de segunda-feira a sexta-feira, por quatro semanas, esteve associado a menores valores de insulina plasmática ao final da primeira e da quarta semana, que se restauravam nos respectivos finais de semana, quando os animais podiam descansar (Barf et al., 2012). Apesar de não termos encontrado alterações homogêneas relevantes na expressão de genes clock, estes são sensíveis às mudanças ambientais e associados a disfunções do metabolismo. Alterações nessa maquinaria pode estar associada a hipoinsulinemia e o desenvolvimento de diabetes (Guan; Lazar, 2021). Animais mutantes para os genes *Clock* e *Bmal1* apresentam menor tolerância à glicose e secreção de insulina (Marcheva et al., 2010).

Nossos animais do grupo MSP tiveram menor expressão relativa do gene *Slc2a2* no fígado, que codifica o transportador de glicose independente de insulina (GLUT2). Mutações para este gene em humanos estão relacionadas com intolerância à glicose (Chadt; Al-Hasani, 2020). Interessantemente, camundongos deficientes do gene *Bmal1* apresentam redução da abundância de GLUT2 no fígado que esteve associado a hipoglicemia, redução da deposição de glicogênio nos hepatócitos e alterações na gliconeogênese hepática (Rudic et al., 2004; Lamia et al., 2008). Neste contexto, analisamos a morfologia do tecido hepático, procurando por alterações qualitativas na deposição de glicogênio e não foram observadas diferenças significativas. Também analisamos a expressão do gene *PCK1* no

fígado dos nossos animais, que codifica a transcrição da Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), principal enzima da via gliconeogênica, e não foram observadas alterações. Sobre um incremento na sensibilidade à insulina no final da quarta semana de protocolo no grupo MSP, nós não encontramos explicação plausível. Porém, evidências recentes demonstraram que pulsos de agonismo de glucagon são necessários para uma posterior resposta à insulina frente a uma sobrecarga de insulina exógena em camundongos (Kim et al., 2022). Considerando que o sistema contrarregulatório possa estar superregulado nos animais SP, especulamos que maior secreção de glucagon poderia explicar a maior sensibilidade à insulina neste modelo.

Diferentemente dos machos, ratas fêmeas submetidas ao protocolo tiveram maior incremento da glicemia em resposta a sobrecarga de glicose na segunda semana de protocolo, o que foi normalizado ao final das quatro semanas. Esta aparente adaptabilidade apresentada pode estar relacionada ao ciclo estral destas ratas, não avaliado neste estudo, e o efeito protetor do estrogênio sob a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, já demonstrado em estudos anteriores com outros modelos de desafios metabólicos (Riant et al., 2009; Zimath et al., 2023).

É conhecido o papel do gene clock *Rev-erb* na regulação e função das ilhotas pancreáticas. A regulação negativa de *Rev-erba* impacta a GSIS e inibe a proliferação de células beta in vitro, enquanto nas células alfa é capaz de inibir a secreção de glucagon induzida por baixos níveis de glicose (Vieira et al., 2012; 2013). Nós não encontramos alterações na expressão relativa do gene *Rev-erbβ*, porém a privação de sono também é relacionada com disfunções das ilhotas pancreáticas. Por exemplo, após 6 horas de privação de sono diárias por 4 semanas, foi observada menor secreção de insulina por falhas no ancoramento de grânulos na membrana plasmática (Zhan et al., 2016). Também foi encontrado neste mesmo estudo redução dos níveis de insulina, triacilglicerol e colesterol total plasmáticos, além da redução da expressão de mRNA de genes lipogênicos como *Scd1* e *Srebp1* no fígado, indicando redução na biossíntese de lipídios. Em outro estudo, a privação de sono também reduziu a deposição hepática de triacilglicerol (da Silva et al., 2022). Nossos resultados confirmaram a redução do colesterol total plasmático,

mas não demonstraram diferenças nos níveis de triacilglicerídeos. Contudo, observamos aumento significativo na expressão relativa do gene *Scd1*. Esse gene codifica a expressão da enzima esteroil-CoA dessaturase-1 (SCD1), que catalisa a síntese de ácidos graxos monoinsaturados pela introdução de duplas ligações, que serão posteriormente utilizados para síntese de triacilglicerídeos, ceramidas e colesterol (Miyazaki; Ntambi, 2003). Esta supregulação do gene da *Scd1* poderia explicar o motivo de não termos encontrado redução nos níveis de triacilglicerídeo no plasma e no fígado de nossos animais.

É importante destacar algumas limitações do nosso estudo. Primeiro, a impossibilidade de afirmar que estes animais efetivamente dormiram menos horas que os respectivos animais controles, considerando o ciclo polifásico dos roedores, uma vez que eles poderiam estar repondo este sono nas 20 horas diárias em que não estiveram expostos às plataformas. Segundo, o fato de termos trabalhado com apenas um 'endpoint' para a análise de genes clock inviabiliza uma compreensão mais fidedigna dos marcadores moleculares. Por fim, há a dificuldade de separar o que, efetivamente, é a causa dos desfechos metabólicos encontrados: a perturbação de sono *per se* ou as consequências da ativação do eixo HPA relacionado ao estresse.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que um protocolo mais translacional de perturbação de sono em ratos machos e fêmeas causa redução do peso corporal devido ao catabolismo do tecido adiposo e está associado à intolerância à glicose que é transitória em fêmeas e consistente em machos. Este estudo reforça a necessidade de atenção a quantidade e a qualidade do sono e seus riscos metabólicos.

7 REFERENCIAS

Alqahtani JS, AlRabeeah SM, Aldhahir AM, Siraj R, Aldabayan YS, Alghamdi SM, Alqahtani AS, Alsaif SS, Naser AY, Alwafi H. Sleep Quality, Insomnia, Anxiety, Fatigue, Stress, Memory and Active Coping during the COVID-19 Pandemic. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Apr 19;19(9):4940. doi: 10.3390/ijerph19094940. PMID: 35564337; PMCID: PMC9104759.

Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res*. 2005 Mar;14(1):83-90. doi: 10.1111/j.1365-2869.2004.00428.x. PMID: 15743338.

Antza C, Kostopoulos G, Mostafa S, Nirantharakumar K, Tahrani A. The links between sleep duration, obesity and type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol*. 2021 Dec 13;252(2):125-141. doi: 10.1530/JOE-21-0155. PMID: 34779405; PMCID: PMC8679843.

Barf RP, Desprez T, Meerlo P, Scheurink AJ. Increased food intake and changes in metabolic hormones in response to chronic sleep restriction alternated with short periods of sleep allowance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Jan 1;302(1):R112-7. doi: 10.1152/ajpregu.00326.2011. Epub 2011 Oct 19. PMID: 22012696.

Beaupere C, Liboz A, Fève B, Blondeau B, Guillemain G. Molecular Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 9;22(2):623. doi: 10.3390/ijms22020623. PMID: 33435513; PMCID: PMC7827500.

Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;(217):3-27. doi: 10.1007/978-3-642-25950-0_1. PMID: 23604473; PMCID: PMC3762864.

Buysse DJ. Sleep health: can we define it? Does it matter? *Sleep*. 2014 Jan 1;37(1):9-17. doi: 10.5665/sleep.3298. PMID: 24470692; PMCID: PMC3902880.

Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2010 Feb;33(2):414-20. doi: 10.2337/dc09-1124. Epub 2009 Nov 12. PMID: 19910503; PMCID: PMC2809295.

Carskadon, Mary & Dement, William. (1989). *Normal Human Sleep: An Overview. Principles and Practice of Sleep Medicine*. M.H. Kryger (Ed.). W.B. Saunders, Philadelphia. 3-13.

Chadt A, Al-Hasani H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflugers Arch*. 2020 Sep;472(9):1273-1298. doi: 10.1007/s00424-020-02417-x. Epub 2020 Jun 26. PMID: 32591906; PMCID: PMC7462924.

Chaput JP, McHill AW, Cox RC, Broussard JL, Dutil C, da Costa BGG, Sampasa-Kanyinga H, Wright KP Jr. The role of insufficient sleep and circadian misalignment in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2023 Feb;19(2):82-97. doi: 10.1038/s41574-022-00747-7. Epub 2022 Oct 24. PMID: 36280789; PMCID: PMC9590398.

Colavito V, Fabene PF, Grassi-Zucconi G, Pifferi F, Lamberty Y, Bentivoglio M, Bertini G. Experimental sleep deprivation as a tool to test memory deficits in rodents. *Front Syst Neurosci*. 2013 Dec 13;7:106. doi: 10.3389/fnsys.2013.00106. PMID: 24379759; PMCID: PMC3861693.

da Silva BRD, Nunes PIG, Santos FA, de Bruin PFC, de Bruin VMS. Exercise modifies lipid and glucose metabolism alterations induced by sleep deprivation in mice. *Sleep Sci*. 2022 Jul-Sep;15(3):347-350. doi: 10.5935/1984-0063.20220061. PMID: 36158711; PMCID: PMC9496491.

de Oliveira EM, Visniauskas B, Sandri S, Migliorini S, Andersen ML, Tufik S, Fock RA, Chagas JR, Campa A. Late effects of sleep restriction: Potentiating weight gain and insulin resistance arising from a high-fat diet in mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 Feb;23(2):391-8. doi: 10.1002/oby.20970. Epub 2014 Dec 31. PMID: 25557274.

Deboer T. Technologies of sleep research. *Cell Mol Life Sci*. 2007 May;64(10):1227-35. doi: 10.1007/s00018-007-6533-0. PMID: 17364139; PMCID: PMC2771137.

Diane A, Victoriano M, Fromentin G, Tome D, Larue-Achagiotis C. Acute stress modifies food choice in Wistar male and female rats. *Appetite*. 2008 Mar-May;50(2-3):397-407. doi: 10.1016/j.appet.2007.09.011. Epub 2007 Oct 2. PMID: 17996981.

Emerson KG. Coping with being cooped up: Social distancing during COVID-19 among 60+ in the United States. *Rev Panam Salud Publica*. 2020 Jun 29;44:e81. doi: 10.26633/RPSP.2020.81. PMID: 32612645; PMCID: PMC7323755.

Fu DA, Campbell-Thompson M. Periodic Acid-Schiff Staining with Diastase. *Methods Mol Biol*. 2017;1639:145-149. doi: 10.1007/978-1-4939-7163-3_14. PMID: 28752454.

Galvão M de O, Sinigaglia-Coimbra R, Kawakami SE, Tufik S, Suchecki D. Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food

intake and stress response. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Sep;34(8):1176-83. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.03.003. Epub 2009 Apr 5. PMID: 19346078.

Garaulet M, Ordovás JM, Madrid JA. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2010 Dec;34(12):1667-83. doi: 10.1038/ijo.2010.118. Epub 2010 Jun 22. PMID: 20567242; PMCID: PMC4428912.

Gomes MM, Quinbones MS, Engelhardt E. Neurofisiologia do sono e aspectos farmacoterapêuticos dos seus transtornos. *Rev Bras Neurol*, v.46, n.1, p.5-15, 2010.

Gourley SL, Taylor JR. Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2009 Oct;Chapter 9:Unit 9.32. doi: 10.1002/0471142301.ns0932s49. PMID: 19802817; PMCID: PMC2774936.

Graves LA, Heller EA, Pack AI, Abel T. Sleep deprivation selectively impairs memory consolidation for contextual fear conditioning. *Learn Mem*. 2003 May-Jun;10(3):168-76. doi: 10.1101/lm.48803. PMID: 12773581; PMCID: PMC202307.

Guan D, Lazar MA. Interconnections between circadian clocks and metabolism. *J Clin Invest*. 2021 Aug 2;131(15):e148278. doi: 10.1172/JCI148278. PMID: 34338232; PMCID: PMC8321578.

Hamilton A, Zhang Q, Salehi A, Willems M, Knudsen JG, Ringgaard AK, Chapman CE, Gonzalez-Alvarez A, Surdo NC, Zaccolo M, Basco D, Johnson PRV, Ramracheya R, Rutter GA, Galione A, Rorsman P, Tarasov AI. Adrenaline Stimulates Glucagon Secretion by Tpc2-Dependent Ca²⁺ Mobilization From Acidic Stores in Pancreatic α -Cells. *Diabetes*. 2018 Jun;67(6):1128-1139. doi: 10.2337/db17-1102. Epub 2018 Mar 21. PMID: 29563152; PMCID: PMC6258900.

Havekes R, Vecsey CG, Abel T. The impact of sleep deprivation on neuronal and glial signaling pathways important for memory and synaptic plasticity. *Cell Signal*. 2012 Jun;24(6):1251-60. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.02.010. PMID: 22570866; PMCID: PMC3622220.

Hipólido DC, Suchecki D, Pimentel de Carvalho Pinto A, Chiconelli Faria E, Tufik S, Luz J. Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *J Neuroendocrinol*. 2006 Apr;18(4):231-8. doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01412.x. PMID: 16503918.

Jha PK, Foppen E, Kalsbeek A, Challet E. Sleep restriction acutely impairs glucose tolerance in rats. *Physiol Rep.* 2016 Jun;4(12):e12839. doi: 10.14814/phy2.12839. PMID: 27354542; PMCID: PMC4923238.

Karatsoreos IN, Bhagat S, Bloss EB, Morrison JH, McEwen BS. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 25;108(4):1657-62. doi: 10.1073/pnas.1018375108. Epub 2011 Jan 10. PMID: 21220317; PMCID: PMC3029753.

Katano S, Nakamura Y, Nakamura A, Murakami Y, Tanaka T, Takebayashi T, Okayama A, Miura K, Okamura T, Ueshima H; HIPOP-OHP Research Group. Relationship between sleep duration and clustering of metabolic syndrome diagnostic components. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2011;4:119-25. doi: 10.2147/DMSO.S16147. Epub 2011 Apr 4. PMID: 21660295; PMCID: PMC3107694.

Kim T, Nason S, Antipenko J, Finan B, Shalev A, DiMarchi R, Habegger KM. Hepatic mTORC2 Signaling Facilitates Acute Glucagon Receptor Enhancement of Insulin-Stimulated Glucose Homeostasis in Mice. *Diabetes.* 2022 Oct 1;71(10):2123-2135. doi: 10.2337/db21-1018. PMID: 35877180; PMCID: PMC9501720.

Kinlein SA, Phillips DJ, Keller CR, Karatsoreos IN. Role of corticosterone in altered neurobehavioral responses to acute stress in a model of compromised hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Psychoneuroendocrinology.* 2019 Apr;102:248-255. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.12.010. Epub 2018 Dec 11. PMID: 30594817; PMCID: PMC7649055.

Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E. The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev.* 2007 Jun;11(3):163-78. doi: 10.1016/j.smrv.2007.01.002. Epub 2007 Apr 17. PMID: 17442599; PMCID: PMC1991337.

Konakanchi S, Raavi V, MI HK, Shankar Ms V. Effect of chronic sleep deprivation and sleep recovery on hippocampal CA3 neurons, spatial memory and anxiety-like behavior in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2022 Jan;187:107559. doi: 10.1016/j.nlm.2021.107559. Epub 2021 Nov 20. PMID: 34808338.

Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 30;105(39):15172-7. doi: 10.1073/pnas.0806717105. Epub 2008 Sep 8. PMID: 18779586; PMCID: PMC2532700.

Li Y, Ma J, Yao K, Su W, Tan B, Wu X, Huang X, Li T, Yin Y, Tosini G, Yin J. Circadian rhythms and obesity: Timekeeping governs lipid metabolism. *J Pineal*

Res. 2020 Oct;69(3):e12682. doi: 10.1111/jpi.12682. Epub 2020 Aug 7. PMID: 32656907.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

Maniam J, Morris MJ. The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology*. 2012 Jul;63(1):97-110. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.017. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22710442.

Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X, Takahashi JS, Bass J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010 Jul 29;466(7306):627-31. doi: 10.1038/nature09253. PMID: 20562852; PMCID: PMC2920067.

Martí O, Martí J, Armario A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav*. 1994 Apr;55(4):747-53. doi: 10.1016/0031-9384(94)90055-8. PMID: 8190805.

Mignot E. Why we sleep: the temporal organization of recovery. *PLoS Biol*. 2008 Apr 29;6(4):e106. doi: 10.1371/journal.pbio.0060106. PMID: 18447584; PMCID: PMC2689703.

Miner B, Stone KL, Zeitzer JM, Han L, Doyle M, Blackwell T, Gill TM, Redeker NS, Hajduk A, Yaggi HK. Self-reported and actigraphic short sleep duration in older adults. *J Clin Sleep Med*. 2022 Feb 1;18(2):403-413. doi: 10.5664/jcsm.9584. PMID: 34338629; PMCID: PMC8804982.

Miyazaki M, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003 Feb;68(2):113-21. doi: 10.1016/s0952-3278(02)00261-2. PMID: 12538075.

Motta K, Barbosa AM, Bobinski F, Boschero AC, Rafacho A. JNK and IKK β phosphorylation is reduced by glucocorticoids in adipose tissue from insulin-resistant rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015 Jan;145:1-12. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.09.024. Epub 2014 Sep 28. PMID: 25268311.

Natividade da Silva F, Zimath PL, do Amaral TA, Martins JRN, Rafacho A. Coadministration of olanzapine causes minor impacts on the diabetogenic outcomes induced by dexamethasone treatment in rats. *Life Sci*. 2023 Jun 1;322:121660. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121660. Epub 2023 Apr 1. PMID: 37011876.

Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*. 2000 May;43(5):533-49. doi: 10.1007/s001250051341. PMID: 10855527.

Park SY, Gautier JF, Chon S. Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. *Diabetes Metab J*. 2021 Sep;45(5):641-654. doi: 10.4093/dmj.2021.0220. Epub 2021 Sep 30. PMID: 34610719; PMCID: PMC8497920.

Perelis M, Marcheiva B, Ramsey KM, Schipma MJ, Hutchison AL, Taguchi A, Peek CB, Hong H, Huang W, Omura C, Allred AL, Bradfield CA, Dinner AR, Barish GD, Bass J. Pancreatic β cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science*. 2015 Nov 6;350(6261):aac4250. doi: 10.1126/science.aac4250. PMID: 26542580; PMCID: PMC4669216.

Pires GN, Bezerra AG, Tufik S, Andersen ML. Effects of experimental sleep deprivation on anxiety-like behavior in animal research: Systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Sep;68:575-589. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.028. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27345144.

Rafacho A, Cestari TM, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Apr;296(4):E681-9. doi: 10.1152/ajpendo.90931.2008. Epub 2009 Jan 21. PMID: 19158320.

Rafacho A, Ribeiro DL, Boschero AC, Taboga SR, Bosqueiro JR. Increased pancreatic islet mass is accompanied by activation of the insulin receptor substrate-2/serine-threonine kinase pathway and augmented cyclin D2 protein levels in insulin-resistant rats. *Int J Exp Pathol*. 2008 Aug;89(4):264-75. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00588.x. Epub 2008 Apr 21. PMID: 18429991; PMCID: PMC2525779.

Rahman MS, Hossain KS, Das S, Kundu S, Adegoke EO, Rahman MA, Hannan MA, Uddin MJ, Pang MG. Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 15;22(12):6403. doi: 10.3390/ijms22126403. PMID: 34203830; PMCID: PMC8232639.

Raven F, Meerlo P, Van der Zee EA, Abel T, Havekes R. A brief period of sleep deprivation causes spine loss in the dentate gyrus of mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2019 Apr;160:83-90. doi: 10.1016/j.nlm.2018.03.018. Epub 2018 Mar 24. PMID: 29588221; PMCID: PMC6420875.

Reinke H, Asher G. Crosstalk between metabolism and circadian clocks. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Apr;20(4):227-241. doi: 10.1038/s41580-018-0096-9. PMID: 30635659.

Revel FG, Gottowik J, Gatti S, Wettstein JG, Moreau JL. Rodent models of insomnia: a review of experimental procedures that induce sleep disturbances.

Neurosci Biobehav Rev. 2009 Jun;33(6):874-99. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.03.002. Epub 2009 Mar 14. PMID: 19428498.

Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology*. 2009 May;150(5):2109-17. doi: 10.1210/en.2008-0971. Epub 2009 Jan 22. PMID: 19164473.

Roesler R, Walz R, Quevedo J, de-Paris F, Zanata SM, Graner E, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res Mol Brain Res*. 1999 Aug 25;71(2):349-53. doi: 10.1016/s0169-328x(99)00193-x. PMID: 10521590.

Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, Fitzgerald GA. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol*. 2004 Nov;2(11):e377. doi: 10.1371/journal.pbio.0020377. Epub 2004 Nov 2. PMID: 15523558; PMCID: PMC524471.

Santos CD, da Silva JS, Brunetta HS, Chagas TR, Zoccal DB, Nunes EA, Rafacho A. Impact of combined long-term fructose and prednisolone intake on glucose and lipid homeostasis in rats: benefits of intake interruption or fish oil administration. *J Nutr Biochem*. 2021 Apr;90:108572. doi: 10.1016/j.jnutbio.2020.108572. Epub 2020 Dec 31. PMID: 33388348.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 2000 Feb;21(1):55-89. doi: 10.1210/edrv.21.1.0389. PMID: 10696570.

Serin Y, Acar Tek N. Effect of Circadian Rhythm on Metabolic Processes and the Regulation of Energy Balance. *Ann Nutr Metab*. 2019;74(4):322-330. doi: 10.1159/000500071. Epub 2019 Apr 23. PMID: 31013492.

Spiegel K, Tasali E, Leproult R, Van Cauter E. Effects of poor and short sleep on glucose metabolism and obesity risk. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 May;5(5):253-61. doi: 10.1038/nrendo.2009.23. PMID: 19444258; PMCID: PMC4457292.

Suchecki D, Lobo LL, Hipólido DC, Tufik S. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *J Sleep Res*. 1998 Dec;7(4):276-81. doi: 10.1046/j.1365-2869.1998.00122.x. PMID: 9844854.

Suchecki D, Tiba PA, Tufik S. Paradoxical sleep deprivation facilitates subsequent corticosterone response to a mild stressor in rats. *Neurosci Lett*.

2002 Mar 1;320(1-2):45-8. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00024-1. PMID: 11849760.

Topal F, Goren H, Yucel F, Sahinturk V, Aydar Y. Effect of consuming high-fat diet on the morphological parameters of adrenal gland. *Bratisl Lek Listy*. 2019;120(8):593-600. doi: 10.4149/BLL_2019_097. PMID: 31379183.

Toth LA, Bhargava P. Animal models of sleep disorders. *Comp Med*. 2013 Apr;63(2):91-104. PMID: 23582416; PMCID: PMC3625050.

Vaughan CH, Zarebidaki E, Ehlen JC, Bartness TJ. Analysis and measurement of the sympathetic and sensory innervation of white and brown adipose tissue. *Methods Enzymol*. 2014;537:199-225. doi: 10.1016/B978-0-12-411619-1.00011-2. PMID: 24480348; PMCID: PMC4004027.

Venancio DP, Suchecki D. Prolonged REM sleep restriction induces metabolic syndrome-related changes: Mediation by pro-inflammatory cytokines. *Brain Behav Immun*. 2015 Jul;47:109-17. doi: 10.1016/j.bbi.2014.12.002. Epub 2014 Dec 20. PMID: 25532784.

Vieira E, Marroquí L, Batista TM, Caballero-Garrido E, Carneiro EM, Boschero AC, Nadal A, Quesada I. The clock gene *Rev-erb α* regulates pancreatic β -cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology*. 2012 Feb;153(2):592-601. doi: 10.1210/en.2011-1595. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22166979.

Vieira E, Marroquí L, Figueroa AL, Merino B, Fernandez-Ruiz R, Nadal A, Burriss TP, Gomis R, Quesada I. Involvement of the clock gene *Rev-erb alpha* in the regulation of glucagon secretion in pancreatic alpha-cells. *PLoS One*. 2013 Jul 25;8(7):e69939. doi: 10.1371/journal.pone.0069939. PMID: 23936124; PMCID: PMC3723646.

Wefers J, van Moorsel D, Hansen J, Connell NJ, Havekes B, Hoeks J, van Marken Lichtenbelt WD, Duez H, Phielix E, Kalsbeek A, Boekschoten MV, Hooiveld GJ, Hesselink MKC, Kersten S, Staels B, Scheer FAJL, Schrauwen P. Circadian misalignment induces fatty acid metabolism gene profiles and compromises insulin sensitivity in human skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jul 24;115(30):7789-7794. doi: 10.1073/pnas.1722295115. Epub 2018 Jul 9. PMID: 29987027; PMCID: PMC6065021.

Zhan S, Wu Y, Sun P, Lin H, Zhu Y, Han X. Decrease in Circulating Fatty Acids Is Associated with Islet Dysfunction in Chronically Sleep-Restricted Rats. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 14;17(12):2102. doi: 10.3390/ijms17122102. PMID: 27983645; PMCID: PMC5187902.

Zhang W, Zhang W, Dai N, Han C, Wu F, Wang X, Tan L, Li J, Li F, Ren Q. A Rat Model of Central Fatigue Using a Modified Multiple Platform Method. *J Vis*

Exp. 2018 Aug 14;(138):57362. doi: 10.3791/57362. PMID: 30175994; PMCID: PMC6126791.

Zhu B, Shi C, Park CG, Zhao X, Reutrakul S. Effects of sleep restriction on metabolism-related parameters in healthy adults: A comprehensive review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sleep Med Rev.* 2019 Jun;45:18-30. doi: 10.1016/j.smrv.2019.02.002. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30870662.

Zimath PL, Almeida MS, Bruxel MA, Rafacho A. Oral mometasone furoate administration preserves anti-inflammatory action with fewer metabolic adverse effects in rats. *Biochem Pharmacol.* 2023 Apr;210:115486. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115486. Epub 2023 Mar 7. PMID: 36893817.