

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO  
MESTRADO EM NUTRIÇÃO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BASES EXPERIMENTAIS DA NUTRIÇÃO

DANIELA AQUINO DE OLIVEIRA

INFLUÊNCIA DA OMISSÃO DA PRIMEIRA REFEIÇÃO DA FASE ATIVA DE  
RATAS ADOLESCENTES SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL NA VIDA  
ADULTA QUANDO SE ALIMENTAM SUBSEQUENTEMENTE DE DIETA  
PADRÃO OU OCIDENTALIZADA

RECIFE

2017

DANIELA AQUINO DE OLIVEIRA

Influência da omissão da primeira refeição da fase ativa de ratas adolescentes sobre o estado nutricional na vida adulta quando se alimentam subsequentemente de dieta padrão ou ocidentalizada

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth do Nascimento, professora adjunta do Departamento de Nutrição da UFPE.

RECIFE  
2017

Catálogo na Fonte Bibliotecária:  
Mônica Uchôa, CRB4-1010

O48i

Oliveira, Daniela Aquino de.

Influência da omissão da primeira refeição da fase ativa de ratas adolescentes sobre o estado nutricional na vida adulta quando se alimentam subsequentemente de dieta padrão ou ocidentalizada / Daniela Aquino de Oliveira.– 2017.

63 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Elizabeth do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2017.

Inclui referências.

1. Ingestão alimentar. 2. Restrição. 3. Ciclo circadiano. 4. Ratas. I. Nascimento, Elizabeth do (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-336)

**DANIELA AQUINO DE OLIVEIRA**

**INFLUÊNCIA DA OMISSÃO DA PRIMEIRA REFEIÇÃO DA FASE ATIVA DE  
RATAS ADOLESCENTES SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL NA VIDA  
ADULTA QUANDO SE ALIMENTAM SUBSEQUENTEMENTE DE DIETA  
PADRÃO OU OCIDENTALIZADA**

Dissertação aprovada em 18/09/2017

---

Profª Drª Amanda Alves Marcelino da Silva  
Universidade de Pernambuco - UPE

---

Profª Drª Tássia Karin Ferreira Borba  
Departamento de Nutrição / UFPE

---

Profª Drª Gisélia de Santana Muniz  
Departamento de Nutrição / UFPE

RECIFE

2017

Dedico este trabalho ao meu filho Bento, que é o ser mais precioso do mundo! Por trazer tanto amor (o maior de todos, que eu ainda não conhecia) e felicidade para minha vida. Por fazer de mim um ser humano melhor, mais tolerante e mais paciente. Te amo infinitamente, minha vida!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por conseguir realizar mais um objetivo na minha vida.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth do Nascimento, por ter aceitado ser minha orientadora, pelos ensinamentos e ideias brilhantes. Admiro demais o seu trabalho. Obrigada por tudo, não tenho palavras para descrever a minha imensa gratidão.

À minha grande e querida família, especialmente a minhas irmãs Gabriela, Thais e Luísa, à minha mãe Roberta, e ao meu pai Ricardo, que me ajudaram muito, SEMPRE, especialmente nos cuidados com Bento, que na época do experimento era bebezinho. E por toda força e incentivo, acreditando em mim muito mais do que eu mesma acreditei. Essa conquista também é de vocês.

Ao estagiário Gutemberg, pela total disponibilidade, gentileza e dedicação. Contribuiu muito para a conclusão deste trabalho. À estagiária Alexandra, que já no final do experimento ajudou muito, sempre disponível.

Aos queridos amigos que conheci no mestrado Carol, Camila, Dilcia, Érika, Maryane, Débora, Raphael, Nath Melo e Nath Cavalcanti. Todos são muito especiais.

À minha querida Mariana Ramalho, que esteve comigo desde o começo, quero tê-la sempre perto de mim.

Ao doutorando Cornélio e à Professora Gisélia, sempre muito generosos e pacientes. Desejo muito sucesso a vocês.

Às professoras Amanda e Raquel, da banca examinadora da qualificação, pelas revisões e críticas construtivas, que só fizeram melhorar o trabalho.

Às secretárias Neci, Cecília e Andréa, sempre disponíveis a ajudar.

Aos funcionários Seu Pedro e Manoel e ao Veterinário Sr. França pela disponibilidade sempre, me ajudando desde o início.

A todos, o meu muito obrigada! Fica até difícil agradecer a cada uma dessas pessoas maravilhosas, da forma como merecem. Considero-me uma pessoa abençoada por ter tido sempre, nesses 2 anos e meio, pessoas do bem, dispostas a ajudar de coração aberto e sem querer nada em troca. Isso é muito especial.

## Resumo

**Introdução.** Uma adequada alimentação ao longo da vida é um dos fatores mais relevantes para o alcance de um bom estado de saúde. A primeira refeição do dia, após um período de jejum, é considerada importante para o aporte nutricional, energético e, por conseguinte, do desempenho cognitivo. Em nível mundial, estudos apontam que ocorre grande omissão do café da manhã principalmente por crianças e adolescentes do sexo feminino. Essa supressão tem sido recentemente associada às inadequações nutricionais e risco de desenvolvimento de excesso de gordura corporal e mudanças metabólicas. **Objetivo.** Avaliar o consumo alimentar e o estado nutricional de ratas segundo a ingestão ou não da refeição nas primeiras 4h da fase escura do ciclo de 24 horas quando alimentadas subsequentemente com dieta comercial ou dieta ocidentalizada. **Métodos.** Foram utilizadas ratas *Wistar* com 45 dias de vida ( $\pm 1$ ) e com peso médio de 125g ( $\pm 14$ g) que foram acompanhadas até 170 dias ( $\pm 2$ ) de vida. A partir da manipulação nutricional foram formados 3 grupos: grupo Controle com dieta comercial (GC, n=8-10), grupo com restrição de alimento por 4 horas seguido de dieta comercial (GRC, n=8-10) e grupo com restrição de alimento por 4 horas seguido de dieta ocidentalizada (GRO, n=8-10). Medidas de peso corporal, dosagens bioquímicas, consumo alimentar, curva glicêmica na fase escura, teste de tolerância à glicose, peso de gordura abdominal, de órgãos e histologia hepática, foram realizados nos grupos. **Resultados.** A alteração da disponibilidade de alimento nas primeiras 4 horas da fase escura do ciclo não alterou o peso corporal das fêmeas e a tolerância à glicose no grupo GRO. No entanto, a ausência de alimento por 4 horas causou aumento da gordura abdominal de ambos os grupos restritos em mais de 50% comparado ao grupo GC. O consumo de alimentos no grupo GRO mostrou redução de 25% a partir da 3ª semana, chegando aproximadamente acima de 50% na 17ª semana de acompanhamento. Apesar da redução na ingestão alimentar e energética o grupo GRO demonstrou alterações glicêmicas, lipêmicas e infiltração gordurosa no fígado. **Conclusão.** Os resultados mostraram que a omissão de alimento durante as primeiras 4 horas do dia de ratas adolescentes pode causar distúrbios metabólicos dependentes e independentes da dieta após restrição. Contudo, ambos os grupos, mostraram acentuado incremento de gordura na região abdominal o que pode induzir a distúrbios metabólicos e predisposição ao desenvolvimento de doenças crônicas.

**Palavras-chave:** Ingestão alimentar. Restrição. Ciclo circadiano. Ratas.

## Abstract

**Introduction.** Appropriate alimentation in a long life span is one of the most relevant factors to the achievement of good health conditions. The first meal of the day, after a fasting period, is considered important to the nutritional and energetic intake, consequently, to the cognitive performance. In a global level, researches indicate the occurrence of a great omission of the breakfast mainly in children and female adolescents. This suppression has been recently associated to nutritional insufficiency, a risk to develop excess of body fat and metabolic changes. **Objective.** This research aimed to evaluate the food intake and nutritional status of female rats according to the ingestion or non-ingestion during the first 4 hours of the dark -phase in a 24-hour cycle when fed subsequently with standard diet or westernized diet. **Methods.** Female rats *Wistar* were used, aging 45 days old ( $\pm 1$ ) with an average weight of 125g ( $\pm 14$ g), which had been monitored until 170 days old ( $\pm 2$ ). With the nutritional manipulation beginning, three groups were formed: control group with standard diet (CG, n = 8-10), a group with 4-hour food restriction following a standard diet (RCG, n = 8-10), and a group with 4-hour restriction following a westernized diet (RWG, n = 8-10). Measurements of body weight, biochemical characteristics, food intake, blood glucose and food intake during the dark-phase, glucose tolerance test, abdominal adipose tissue weight and other organs, and hepatic histology were realized. **Results.** The alteration of availability of food during the first 4 hours of the dark phase did not modify the body weight and the glucose tolerance test of the female rats in the RWG. However, the absence of food in a 4-hour period led to the increase of abdominal fat in both restriction groups in more than 50% comparing to the CG. The food intake in the RWG evidenced a 25% decrease from the third week, reaching slightly above 50% on the seventeenth week. Despite the food and energetic intake reduction, the RWG evidenced glycemic and lipid alterations, and fat infiltration in the liver. **Conclusion.** Results demonstrated that the restriction of food during the first 4 hours of the day in female adolescent rats can lead to metabolic disorders depending or independently of the diet after the restriction. Notwithstanding, both groups evidenced a marked increase of abdominal adipose tissue, which may induce to metabolic disorders and development of chronic disorders predisposition.

**Key words:** Food intake. Restriction. Circadian rhythm. Female rats.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>CCS</b>	Centro de Ciências da Saúde
<b>CCK</b>	Colecistocinina
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DO</b>	Dieta Ocidentalizada
<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein (lipoproteína de alta densidade)
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
<b>SM</b>	Síndrome Metabólica
<b>TGO</b>	Transaminase Glutâmica Oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase Glutâmica Pirúvica
<b>TOTG</b>	Teste Oral de Tolerância à Glicose
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>VET</b>	Valor Energético Total
<b>VIGITEL</b>	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoprotein (lipoproteína de muito baixa densidade)

## **Grupos Experimentais**

<b>GC</b>	Dieta Comercial <i>ad libitum</i>
<b>GRC</b>	Dieta Comercial com privação de alimento de 8-12h
<b>GRO</b>	Dieta Ocidentalizada com privação de alimento de 8-12h

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Ilustração da dieta comercial.....	<b>29</b>
<b>Figura 2</b> – Ilustração da dieta ocidentalizada.....	<b>30</b>
<b>Figura 3</b> – Evolução do peso corporal (g) das fêmeas durante o período experimental. Valores expressos em média $\pm$ EPM. Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC = grupo restrito, dieta comercial. GRO = grupo restrito, dieta ocidentalizada.....	<b>35</b>
<b>Figura 4</b> – Glicemia realizada na fase escura, a cada 4 horas por um período de 12 horas. Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC = grupo restrito, dieta comercial; GRO = grupo restrito, dieta ocidentalizada.....	<b>36</b>
<b>Figura 5</b> – Teste oral de tolerância à glicose realizado aos 120 dias de vida. Valores expressos em média $\pm$ EPM. Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC = grupo restrito, dieta comercial; GRO = grupo restrito, dieta ocidentalizada.....	<b>37</b>
<b>Figura 6</b> – Média de consumo diário por gaiola (2 animais cada). Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC = grupo restrito, dieta comercial; GRO = grupo restrito, dieta ocidentalizada.....	<b>38</b>
<b>Figura 7</b> – Média de consumo (A) e energia (B) diário por gaiola (2 animais cada) segundo horários da fase escura, a totalidade da fase escura e totalidade da fase clara. Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC = grupo restrito, dieta comercial; GRO = grupo restrito, dieta ocidentalizada.....	<b>39</b>
<b>Figura 8</b> – Percentual de aumento de tecido adiposo abdominal. Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC = grupo restrito, dieta comercial; GRO = grupo restrito, dieta ocidentalizada.....	<b>40</b>
<b>Figura 9A</b> – Fotomicrografia do fígado de ratas com dieta comercial <i>ad libitum</i> . Com gotículas de lipídios evidentes sinalizadas pelas setas pretas.....	<b>42</b>
<b>Figura 9B</b> – Fotomicrografia do fígado de ratas submetidas à restrição alimentar de 4 horas na fase escura do ciclo, seguida de dieta comercial, com mínima concentração de gordura.....	<b>43</b>
<b>Figura 9C</b> – Fotomicrografia do fígado de ratas submetidas à restrição alimentar de 4 horas na fase escura do ciclo, seguida de dieta ocidentalizada, com evidente acúmulo de gordura caracterizando esteatose hepática.....	<b>44</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Desenho dos grupos experimentais.....	<b>29</b>
<b>Quadro 2</b> – Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) das dietas comercial e ocidentalizada, baseadas na AIN-93G para roedores.....	<b>30</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação do IMS segundo a OMS, 1998.....	<b>19</b>
<b>Tabela 2</b> – Efeito da dieta sobre os parâmetros bioquímicos de ratas.....	<b>41</b>

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b>	15
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	18
2.1 RITMO DA ALIMENTAÇÃO E DISTÚRBIOS METABÓLICOS	18
2.2 GANHO DE PESO E OBESIDADE	22
2.3 DIETA OCIDENTALIZADA: REPERCUSSÕES NA SAÚDE	24
<b>3 HIPÓTESES</b>	27
<b>4 OBJETIVOS</b>	28
4.1 OBJETIVO GERAL	28
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
<b>5 MÉTODOS</b>	29
5.1 ANIMAIS	29
5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	29
5.3 DIETAS	30
5.4 AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO PONDERAL	31
5.5 CONSUMO ALIMENTAR	32
5.6 PADRÃO CIRCADIANO DO CONSUMO ALIMENTAR E GLICEMIA	32
5.7 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	32
5.8 AVALIAÇÕES <i>POST MORTEN</i>	32
5.8.1 Avaliação bioquímica de glicose e lipídios	33
5.8.2 Histologia hepática	33
5.8.3 Peso dos órgãos úmidos	33
<b>6 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	34
<b>7 RESULTADOS</b>	35
<b>8 DISCUSSÃO</b>	45
<b>9 CONCLUSÕES</b>	51
Referências	52
Anexo	62
ANEXO A – Aprovação da comissão de ética em animais	63

## 1 APRESENTAÇÃO

Uma adequada alimentação ao longo da vida é um dos fatores mais relevantes para o alcance da saúde. O estilo de vida atual nos leva à negligenciar algumas refeições, entre estas o café da manhã. Diversos estudos ao redor do mundo mostram que o café da manhã é omitido por várias pessoas incluindo crianças e adolescentes (LEIDY HJ e HACKI EM, 2010). Este comportamento leva a reduzida ingestão de nutrientes preconizados pelas recomendações dietéticas, assim como um inadequado consumo de energia na dieta (NICKLAS TA et al., 2000; DWYERT, 2001; PEREIRA MA et al, 2011), ou ainda, a busca por alimentação inadequada de alta densidade energética (DUBOIS et al., 2007).

A ingestão alimentar em humanos possui um ritmo endógeno ou biológico ao longo de 24 horas intercalados por períodos de fome e saciedade registrados no início da manhã e final do dia (FRANK SCHEER et al., 2013) que podem ser modulados por fatores extrínsecos ou ambientais (FONKEN et. al., 2010), e parece ter influência do sexo sobre a preferência de macronutrientes (DE CASTRO JM, 1987). Em animais o ritmo alimentar mostra oscilação semelhante aos observados em humanos com picos na primeira refeição e na última refeição do período escuro (NASCIMENTO et al., 2013).

O funcionamento endógeno está associado a ritmos biológicos, que são definidos como alterações ao longo de um período temporal. Dentre os ritmos biológicos do organismo, os mais comuns são os ritmos circadianos, definidos como aqueles que se repetem com periodicidade ao redor de 24 horas (BELISIO et al, 2012). Para que ocorra a ritmicidade circadiana (circa = próximo e diano = dia) endógena em um ser vivo, é necessário que alguma estrutura opere como um marca-passo. Estruturas consideradas “marca-passos” podem ser definidas como osciladores primários, que exibem um padrão de movimento temporal geneticamente determinado, autossustentado e endógeno, mesmo na ausência de pistas temporais externas (MARKUS RP et al., 2003).

A investigação da frequência de refeições com o processo de saúde e doença ainda é um tema controverso e pouco esclarecido. O desjejum ou café da manhã é conhecido como uma das principais refeições do dia por ter a finalidade de repor os

estoques de glicogênio hepático após uma noite de jejum e contribuir para o aporte energético e nutricional recomendado (BETTS et al., 2014). Novas perspectivas e questionamentos têm surgido no que tange a sua associação com distúrbios metabólicos que culminam com o excesso de gordura corporal (RODRIGUES PRM et al., 2012; RODRIGUES et al., 2016). Um estudo com escolares, de ambos os sexos, de 10 a 18 anos, observou elevado risco de síndrome metabólica nos grupos que ingeriam raramente café da manhã comparados aos que o ingeriam regularmente (GITA SHAFIEE et al., 2013). No Canadá, estudo com crianças pré-escolares mostrou que 10% das crianças não consumia o café da manhã todos os dias da semana. Este comportamento foi associado a uma menor qualidade energética e nutricional seguida de maior ingestão de lanches mais calóricos e ricos em carboidrato durante à tarde e à noite (DUBOIS et al., 2007). No Brasil, estudos mostraram uma positiva associação entre hábito de não realizar o desjejum e o risco de obesidade em meninos (RODRIGUES PRM et al., 2012; DOS SANTOS CORREA et al., 2016). Em conjunto, achados da literatura têm apontado que omitir o café da manhã parece influenciar o risco de ganho de peso e obesidade (DE CASTRO JM, 2007; DOS SANTOS CORREA et al., 2016).

A partir da exposição de fatores supracitados, o estudo investigou em ratas, se a omissão da ingestão de alimento nas primeiras 4 horas do período noturno ou de maior atividade do animal, influencia na mudança de peso e gordura corporal, bem como, de alterações metabólicas. Acresça-se a esta investigação se essa alteração é modulada pela composição da dieta. Ou seja, se a composição da dieta a seguir à refeição suprimida tem alguma influência sobre os parâmetros analisados. O estudo aponta para o caráter exploratório e inovador de um tema pouco esclarecido que pode mostrar um novo olhar sobre o risco de desenvolvimento de doenças crônicas a partir de um estudo experimental em ratas.

A proposta de desenvolver este estudo em ratas adolescentes advém do fato de estudos epidemiológicos apontarem que o sexo feminino é mais vulnerável à omissão da primeira refeição do dia (RAMPERSAUD et al., 2005 e MARCHIONI DML et al., 2015).

Após término da dissertação, será elaborado um artigo original cujo título provisório proposto é: ***Privação de alimento durante as primeiras 4 horas da fase***



***escura de ratas adolescentes: consequências sobre o peso, gordura visceral e metabolismo.***

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 RITMO DA ALIMENTAÇÃO E DISTÚRBIOS METABÓLICOS

A busca pelo alimento é inata ao ser vivo e fundamental à sobrevivência. Em humanos e em animais, já foi observado que existe um ritmo endógeno de fome e saciedade. Segundo Scheer et al. (2013) existem dois picos de fome, o primeiro é no início da manhã (desjejum, por volta das 8:00 horas) e o último no início da noite (jantar, por volta das 20:00 horas). Existe uma relação direta entre a regulação do sistema circadiano e a alimentação. O ritmo da fome fisiológica em humanos foi previamente publicado e mostra claramente um ritmo em torno de 24 horas (CASTRO, 1986; SCHEER et al., 2013).

Estabelecido décadas atrás, roedores possuem um elevado consumo de alimentos no início e no final da fase escura (KERSTEN A, STRUBBE JH, SPITERI NJ, 1980). Este ritmo alimentar no entanto parece demonstrar um padrão diferenciado em fêmeas influenciado pelo ciclo estral (HAAR, 1972).

O ritmo biológico de diversos parâmetros fisiológicos, a exemplo da alimentação, é estudado pela cronobiologia. Cronobiologia é a ciência que estuda as características temporais da matéria viva, em todos os seus níveis de organização e inclui o estudo dos ritmos biológicos (HALBERG F, 1969). Os organismos vivos, como plantas, animais e seres humanos, são influenciados por estímulos externos, muitos dos quais demonstram padrões cíclicos. Padrões diários de luz e temperatura, por exemplo, são previsíveis, e os animais apresentam a capacidade de anteceder essas ocorrências ambientais cíclicas por alterações regulares e esperadas. Tais padrões cíclicos são denominados de ritmos biológicos (LEMMER B, 2009).

Os ritmos biológicos são classificados em circadianos (oscilações em ciclos em torno de 24h), ultradianos (oscilações em ciclos inferiores a 20h) e infradianos (oscilações em períodos superiores a 28h) (OLIVEIRA C et al., 2013). O ritmo circadiano (do Latim “circa diem”, que significa “cerca de um dia”) (OLIVEIRA C et al., 2013), é definido pela ocorrência num período de 24 horas como, por exemplo, o ciclo sono-vigília, temperatura corporal, atividade e ingestão alimentar (O'REARDON JP et al., 2004) e está associado ao ciclo claro-escuro. É um mecanismo intracelular molecular existente em diversos organismos incluindo o humano, que sincroniza o

ritmo biológico ao ambiente, permitindo uma preparação desse organismo de acordo com estímulos ambientais com o objetivo de manter a homeostase (BRAY et al., 2013).

Na natureza, os animais vivem ajustados a mudanças ambientais periódicas e tal ajuste é denominado sincronização. Alguns fatores externos servem como “indicadores ou doadores de tempo”, como é o caso do sol e são denominados de *zeitgeber* ou sincronizadores (MARKUS RP et al., 2003, YOUNG ME, BRAY MS, 2007). A sincronização dos ritmos biológicos é realizada pelo núcleo supraquiasmático (NSQ), que fica localizado no hipotálamo, uma das estruturas mais importantes do Sistema Nervoso Central (SNC), responsável pela coordenação dos ritmos circadianos, temperatura corporal e fome (O'REARDON JP et al., 2004). Dessa maneira, o NSQ é chamado de “relógios biológicos”, ou osciladores biológicos pois permitem a sincronização do ambiente com o metabolismo corporal.

O NSQ é considerado um sistema sincronizado pela luz, cujas alterações de períodos claros ou escuros podem arrastar ou modificar os osciladores endógenos que trabalham em livre curso. Assim, dizemos que a luz pode arrastar ou sincronizar um oscilador interno (LEO - light entrainable oscillator). O NSQ recebe luz da retina e a transmite para um grupo seletivo de regiões encefálicas (CAVALCANTE, 2008). No entanto, as projeções do NSQ não conseguem explicar todas as alterações fisiológicas e/ou comportamentais em resposta ao ciclo luz/escuridão e outras variáveis podem influenciar esta resposta (BELISIO et al., 2012).

Dentre esses fatores pode-se citar a alimentação como um potente sincronizador de osciladores periféricos, ou seja, todos que estejam localizados fora do NSQ. Dentre os tecidos e órgãos periféricos mais estudados estão o sangue, o tecido adiposo, o pâncreas e o fígado. Esta modulação da atividade de células do oscilador pela alimentação e, por conseguinte da expressão gênica é chamado de oscilador sincronizado ou arrastado pelo alimento (do inglês, Food-entrainable oscillator ou FEO) (DIAZ-MUNOZ et al., 2010). Horários de alimentação ou composição alimentar são fatores estudados como modificadores da expressão de genes relacionados ao metabolismo energético (SCHEER et al., 2013).

Em condições ambientais usuais, os osciladores biológicos são reiniciados diariamente pelo ciclo claro-escuro, isto é, através da influência da luz, que é

considerada o principal zeitgeber (Zt) (SCHULZ P e STEIMER T, 2009). Por exemplo, o momento (fase) de início da atividade está atrelado ao início do dia (nascer do sol) na espécie *Callithrix jacchus* (sagui comum). Para ratos, no entanto, o início da fase de claro está relacionado com o início de sua fase de repouso. Para fins de compreensão do temporizador externo é convenção da cronobiologia denominar Zt0 como início do ciclo claro.

Distúrbios provocados pelas alterações nos horários de sono/vigília influenciam o apetite, a saciedade e, conseqüentemente, a ingestão alimentar. A ingestão habitual normalmente demonstra uma discrepância entre o ritmo endógeno e os horários de ingestão alimentar. Foi observado que as maiores ingestões energéticas ocorrem no meio do dia (por volta de 12h) e no início da noite (por volta de 20h) (SCHEER et al., 2013).

Assim, frequência e/ou a omissão de refeições ao longo do dia têm sido investigado em humanos colocando em teste a importância desses sobre o processo de desenvolvimento de alterações no metabolismo a partir da influência na modulação da expressão de genes osciladores relacionados ao metabolismo energético (SCHEER et al., 2013). Em roedores, o ritmo da alimentação compreende pequenas refeições espaçadas por longos intervalos durante a fase clara (baixa atividade) e grandes refeições com curtos intervalos durante a fase escura (elevada atividade) (LEMAGNEN J; DEVOS M, 1984). Estas evidências podem nos permitir fazer uma analogia entre possíveis conseqüências em humanos relativas à omissão de horários de refeições em roedores, como o rato.

A primeira refeição após uma noite em jejum, o café da manhã ou desjejum, é uma das principais refeições do dia (RAMPERSAU GC, 2005), e normalmente é realizada antes das 10 horas. Segundo a recomendação brasileira, esta refeição deve garantir em média 25% do total energético consumido durante o dia (PHILIPPI ST, 2008). Estudos relacionam o seu consumo habitual com baixo risco de sobrepeso e obesidade (NICKLAS TA et al., 2004; RAMPERSAUD GC, et al., 2005; SONG W, et al., 2005; BRAY et al., 2013), uma vez que este promove aumento da saciedade e, conseqüentemente, diminuição do total de energia ingerida ao longo do dia por reduzir a ingestão de lanches com maior teor de gordura e açúcar (UTTER J et al., 2007), preferidos por crianças e adolescentes.

No entanto, a omissão do café da manhã vem crescendo ao longo do tempo, sendo mais frequente entre os jovens e entre as mulheres (MARCHIONI DML et al., 2015). A ausência de realização do café da manhã por adolescentes do sexo feminino tem sido apontada em estudos anteriores (RAMPERSAUD et al., 2005; SWEENEY NM, HORISHITA N, 2005). Essa diferença entre gêneros pode ser atribuída à imagem corporal e insatisfação com o peso corporal, que atinge principalmente as mulheres. Além disso, jovens que se consideram acima do peso ideal tendem a omitir mais o café da manhã (RAMPERSAUD et al., 2005). Estudos transversais e de observação em jovens examinaram a relação entre a obesidade e a omissão de café da manhã e encontraram uma relação inversa entre a frequência de café da manhã e o índice de massa corporal (ou seja, quanto menor o número de ocasiões alimentares de café da manhã, maior o aumento no índice de massa corporal) (RAMPERSAUD GC, 2005).

Estudos prévios em humanos demonstraram associação entre omissão da primeira refeição do dia com a ingestão de alimentos mais calóricos como refrigerantes, alimentos ricos em gordura saturada e alto teor de açúcares e comer de forma descontrolada ao longo do dia, sobretudo à noite (LEIDY HJ e HACKI EM, 2010). Esta preferência por alimentos nutricionalmente inadequados mostra-se associado a consequências adversas tais como reduzida ingestão de vários nutrientes, incluindo as vitaminas A, C, E, B6 e B12; ferro, cálcio, magnésio, fósforo, potássio e fibra dietética, quando comparados àqueles que ingerem o café da manhã (NICKLAS TA et al., 2000), acompanhado de difícil capacidade de recompensar essa deficiência ao longo do dia.

Apesar da omissão do café da manhã ser reconhecida como fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, existe controversa entre a omissão deste e o aumento de peso corporal. De acordo com o estudo realizado por Marchioni DML et al. (2015), não foi encontrada associação entre omissão de café da manhã e maiores valores para Índice de Massa Corporal (IMC). Vários estudos revelam a associação entre a omissão do café da manhã e hábitos de vida e alimentares não saudáveis. Assim, a relação entre café da manhã e IMC pode variar de acordo com a metodologia utilizada em cada trabalho, ou ainda por ser o IMC um índice não específico para avaliação da composição corporal.

A partir dos estudos epidemiológicos e experimentais que demonstram respectivamente a relação entre omissão do café da manhã e a privação/restrrição de alimento com o risco de desenvolver desordens metabólicas, aumento de gordura corporal e instalação de doenças crônica, considera-se neste estudo que este pode ser um fator adicional para o desenvolvimento de repercussões adversas a saúde dos investigados, como a ocorrência de obesidade.

## 2.2 GANHO DE PESO E OBESIDADE

A obesidade é uma doença crônica de etiologia multifatorial (JACQUES; TIYO, 2012), caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, que não é apenas uma reserva de energia, mas também um órgão endócrino (AHIMA RS, FLIER JS, 2000; WELLEN KE, HOTAMISLIGIL GS, 2003; KALSBECK A, FLEUR SL, FLIER E, 2014). Além disso, possibilita prejuízos à saúde dos indivíduos e está entre os principais problemas de saúde pública do mundo, atingindo todas as faixas etárias da população (WHO, 2000, NISSEN et al., 2012). Dieta hipercalórica, estilo de vida sedentário, fármacos, transtorno alimentar, entre outros, são apontados como causas responsáveis pelo excesso de peso (JACQUES; TIYO, 2012).

No Brasil, o processo de transição nutricional propiciou significativa redução da prevalência de desnutrição e aumento do sobrepeso e obesidade que se estende aos dias atuais (BATISTA FILHO M, RISSIN A, 2003, SCHIMIDT et al., 2011). O excesso de peso é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), dentre elas as doenças cardiovasculares (OPAS, 2003; WHO, 2010).

Medidas de dimensão e composição corporal correspondem a apenas um dos mecanismos pelos quais se pode avaliar o estado nutricional. Outros como a ingestão de alimentos e dados bioquímicos atuam como complementares deste estado.

O excesso de peso é diagnosticado quando o IMC alcança valor igual ou superior a 25 kg/m<sup>2</sup>, enquanto que a obesidade é diagnosticada com valores de IMC superiores a 30 kg/m<sup>2</sup>. Em ratos, não existe pontos de corte ou classificação de excesso de peso e obesidade bem definidos. Contudo, algumas referências prévias apontam algumas maneiras de se diagnosticar o excesso de peso corporal.

Os parâmetros mais utilizados para acompanhamento das mudanças de

composição corporal corresponde ao acompanhamento da massa corporal (FERRAZ et al., 2016) e medidas murinométricas como circunferências (torácica e abdominal), índice de Lee e índice de massa corporal (NOVELLI et al., 2007). Medidas mais sofisticadas também incluem o diagnóstico da composição corporal em ratos como o uso de ressonância magnética (NIXON et al., 2010). Após a eutanásia, medidas como quantificação da gordura corporal total, da gordura abdominal, marcadores bioquímicos e outros podem servir como complemento do diagnóstico de obesidade (NOVELLI et al., 2007).

A obesidade é a condição mais grave do excesso de peso, sendo caracterizada como uma das patologias que constitui o grupo de doenças e agravos não transmissíveis (WHO, 2000). Manifestou-se como uma epidemia em países desenvolvidos durante as últimas décadas do século XX. No entanto, atualmente, atinge todos os níveis socioeconômicos e vem aumentando sua incidência também nos países em desenvolvimento. É uma doença de elevada prevalência no mundo inteiro, e é responsável por repercussões orgânicas e psicossociais, desde a infância até a vida adulta (BERNARDI, 2005).

Segundo os resultados mais recentes da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), nas 27 cidades estudadas e no Distrito Federal, a frequência de excesso de peso foi de 53,9%, sendo maior entre os homens (57,6%) do que entre as mulheres (50,8%). No que se refere à obesidade, a frequência de adultos obesos foi de 18,9%. Em ambos os sexos, a frequência da obesidade mais que duplicou da faixa de 18 a 24 anos para a faixa de 25 a 34 anos de idade (VIGITEL, 2015).

A obesidade é um fenômeno que afeta indivíduos de todas as classes sociais (NG M, FLEMING T, ROBINSON M et al., 2014) e é resultante da ação de fatores ambientais (hábitos alimentares, atividade física e condições psicológicas) sobre indivíduos geneticamente predispostos a apresentar excesso de tecido adiposo (BERNARDI, 2005). A grande preocupação com o incremento da obesidade advém do agravamento da condição de saúde dos indivíduos que compromete a capacidade de trabalho e o desenvolvimento do país causando elevado ônus aos serviços públicos de saúde e sua íntima associação com a incidência de doenças cardiovasculares, hiperlipidemia, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, alguns tipos de câncer, entre outras (BRASIL, 2011).

A gênese da obesidade é complexa, porém existem alguns momentos do ciclo

da vida em que a hiperplasia e/ou hipertrofia de células adiposas encontram-se mais ativas. A adolescência, por exemplo, é um período de risco para o ganho excessivo de massa corporal, caracterizada por mudanças na composição corporal, diminuição da sensibilidade à insulina, comportamentos sedentários e hábitos alimentares inadequados (ALBERGA et al., 2012). Além disso, é uma fase de construção da personalidade, onde os hábitos são estabelecidos por toda a vida sendo muito importante para as intervenções na área de saúde e da nutrição, para evitar hábitos que levem ao ganho excessivo de peso e a doenças crônicas não-transmissíveis (TODD et al., 2015).

De acordo com Duarte (1993) o pico de velocidade de ganho de peso nas meninas geralmente ocorre próximo à primeira menstruação (menarca), no momento de diminuição da velocidade de crescimento, e após isso o ganho de peso está associado com a atuação do estrógeno e da progesterona, que contribuem com o aumento dos adipócitos, e no sexo masculino o ganho ponderal acontece concomitante ao pico de velocidade de crescimento. Nos meninos é observado um maior ganho de massa magra (PIETROBELLI; BONER; TATO, 2005). Enquanto que nas meninas as alterações na composição corporal, incluem tanto o ganho de gordura como a distribuição, havendo uma maior deposição na região dos quadris. Em ratos, o ganho de massa corporal também ocorre de forma diferenciada sendo mais precoce e mais rápida nos machos do que nas fêmeas.

### 2.3 DIETA OCIDENTALIZADA: REPERCURSÕES NA SAÚDE

A Revolução Industrial e a Idade Moderna, marcaram o início do estilo de vida ocidental que foram destacadas por mudanças rápidas e radicais na dieta e no estilo de vida, juntamente com a melhoria da saúde pública (CARRERA-BASTOS et al., 2011). A Revolução Agrícola começou há aproximadamente 11 mil anos no Oriente Médio, depois se espalhou para outras regiões do mundo e alterou drasticamente a dieta e o estilo de vida que moldou o genoma humano. Algumas das mudanças dietéticas mais significativas foram o uso de grãos e de cereais como alimentos básicos, a introdução de leite não humano, carnes, legumes e outros alimentos vegetais cultivados e, posteriormente, uso generalizado de sacarose e bebidas alcoólicas (CORDAIN L, EATON SB, SEBASTIAN A et al., 2005).



No entanto, foi a Revolução Industrial, com o uso generalizado de óleos vegetais, cereais e açúcares refinados, e a era moderna (com o início da indústria de "junk food", inatividade física, introdução de vários poluentes, redução do tempo e qualidade de sono) que provocou as mudanças inadequadas, que podem ser graves consequências fisiopatológicas. Por exemplo, o estresse psicológico crônico, poluição ambiental e tabagismo estão associados à inflamação crônica de baixo grau, a qual é uma das principais causas de resistência à insulina (CARRERA-BASTOS et al., 2011).

Hábitos da cultura ocidental, como alimentação inadequada e sedentarismo (WHO, 1998; MARTINEZ JA, 2000), atingem países em desenvolvimento como o Brasil, onde a denominada transição nos padrões nutricionais (ocidentalização destes padrões), é claramente identificada em conjunto com o declínio da desnutrição e o aumento da obesidade (FRANCISCHI RP, PEREIRA LO, LANCHI JR AH, 2001).

Tendo em vista o atual cenário mundial, nota-se com facilidade que a alimentação é praticamente a mesma na maioria dos países ocidentais, com algumas diferenças em relação às características regionais que influenciam nas escolhas e na maneira de se alimentar. Esta globalização abrange o consumo de alimentos mais industrializados, ultraprocessados, semi-processados ou pré-cozidos, e tem substituído, em proporções relevantes na alimentação atual, o consumo de alimentos classificados como *in natura* (DIEZ GARCIA RW, 2003). Além da maior ingestão desses alimentos industrializados, essa dieta se caracteriza pela maior quantidade de alimentos ricos em carboidratos simples, gorduras saturadas, proteínas de origem animal e de sódio (MENDONÇA CP, ANJOS LA, 2004; SHAFAT A, MURRAY B, RUMSEY D, 2009).

Os grupos de alimentos mais consumidos pelos brasileiros, com maiores médias de consumo de energia (como biscoitos recheados, salgadinhos industrializados, pizzas e refrigerantes) também estão relacionados a dietas com elevado consumo de gorduras saturadas, açúcar e sal, bem como de ingestão insuficiente de fibras (BRASIL, 2011<sup>a</sup>).

De padrão semelhante à dieta ocidentalizada encontra-se a dieta conhecida como dieta de cafeteria ou *junk food*. Em estudos experimentais com ratos, esta se caracteriza pela diversificada oferta de diversos alimentos considerados palatáveis como biscoitos, chocolates, queijos, manteiga, caramelo, batata chips, etc (BAYOL et al., 2005; SHAFAT A, MURRAY B e RUMSEY D, 2009) que tentam mimetizar hábitos alimentares de populações ocidentais (SHAFAT A, MURRAY B e RUMSEY D, 2009).

Alguns estudos têm demonstrado que ratos alimentados com dieta de cafeteria tornam-se obesos, pois a maioria dos itens escolhidos pelos pesquisadores possui elevado teor de gordura e açúcar, e tem alta densidade energética (SHAFAT A, MURRAY B e RUMSEY D, 2009). No entanto, algumas críticas a este modelo tem sido a falta de controle de nutrientes e quilocalorias ingeridos e da inadequação da ingestão de proteínas (CARVALHO MF et al., 2013).

No nosso experimento, utilizamos a dieta ocidentalizada que foi elaborada no Departamento de Nutrição da UFPE, produzida nas versões das fases de crescimento e de manutenção. A composição dessa dieta experimental foi baseada na Pesquisa de Orçamento Familiar (POF 2002/2003) (CARVALHO MF et al., 2013) e no estudo de FERRO CAVALCANTE et al., (2013). De acordo com a POF (2002/2003), as ingestões de gorduras totais e saturadas, açúcares simples e proteínas são mais elevadas do que as encontradas nos últimos levantamentos realizados na década de 1970. Entretanto, a POF mais recente (2008/2009) descobriu que a ingestão de proteínas não aumentou, mas a ingestão total de gordura aumentou ligeiramente (CARVALHO MF et al., 2013).

As principais características da dieta POF são o alto teor de gordura, três vezes maior do que o de uma dieta comercial para roedores e adequado teor de proteína, para roedores em crescimento ou manutenção. Sua composição de macronutrientes é semelhante àquelas da maioria das dietas de cafeteria discutidas na literatura (CARVALHO MF et al., 2013). Em longo prazo, a dieta ocidentalizada tem se mostrado eficaz em induzir o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e esteatose hepática em ratos adultos e em seres humanos (CAVALCANTE et al., 2014; ETXEBERRIA et al., 2015).

### 3 HIPÓTESES

- A ausência de alimento durante as primeiras 4 horas da fase escura durante 5 dias por semana favorecerá alterações no metabolismo lipídico e infiltrações gordurosas no fígado;
- E aumentará a ingestão de alimento e a adiposidade abdominal em ratas que receberem dieta ocidentalizada a seguir as horas de privação.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

- Estudar os aspectos metabólicos de ratas segundo a ingestão ou ausência de alimento nas primeiras 4 horas da fase escura do ciclo de 24 horas quando alimentadas subsequentemente com dieta comercial ou dieta ocidentalizada.

### 4.2 ESPECÍFICOS

Determinar:

- O Consumo alimentar e a evolução ponderal semanal a partir de 45 dias de vida até o término do experimento;
- A quantidade de alimento ingerido na fase escura e claro do ciclo durante 5 dias.
- Parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo hepático, glicêmico e lipídico nos animais ao final do experimento.
- Peso dos órgãos úmidos: tecido adiposo, fígado e estômago, ao final do período experimental;
- Teste de tolerância à glicose, aos 120 dias de vida;
- O conteúdo de adiposidade no fígado, ao final do período experimental.

## 5 MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Biotério Prof<sup>a</sup> Naíde Regueira Teodósio, do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde (CCS) / Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram submetidos à análise e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE com o n° do Protocolo: 23076.017868/2016-36 (**ANEXO**).

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas (n= 30), da linhagem *Wistar*, nascidas de matrizes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, mantidas em número de 2 animais por gaiola. No decorrer do experimento houve a perda de 2 animais (morte natural), uma rata do GC, e outra do GRO. As fêmeas foram mantidas em condições ambientais padrão de biotério com temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade (entre 45% e 55%) e luminosidade controladas, num ciclo de luz (20:00 às 8:00h) e escuridão (8:00 às 20:00h) constante. O intuito de trabalhar com ciclo invertido é causar menos interferência no repouso dos animais, que ocorre na fase clara do ciclo, assim como, ter mais facilidade de aplicar o protocolo experimental pretendido. A escolha por fêmeas foi para mimetizar a ocorrência em humanos que inclui a influência hormonal própria da idade em questão (adolescência) e o fato de que segundo a literatura, o sexo feminino é o que mais frequentemente omite a primeira refeição do dia.

### 5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram compostos três (3) grupos de estudo segundo o protocolo de alteração da disponibilidade da dieta e a alimentação ofertada após o período de omissão da refeição. O grupo controle (GC) recebeu dieta comercial para roedores (Presence®) durante todo o experimento. Os demais grupos tiveram a alimentação retirada no início da fase escura do ciclo, ou seja, de 8:00h às 12:00h. Após esse horário, ofertou-se dieta padrão (GRC) ou ocidentalizada (GRO) de forma *ad libitum* até às 8 horas do dia seguinte. As fêmeas foram mantidas em dupla, e quando houve a morte natural de alguma delas, a que sobreviveu ficou na gaiola de forma individual. Este

procedimento repetiu-se até o final do período experimental de 2ª a 6ª feira. Aos sábados e domingos, a alimentação era ofertada livremente a todos os grupos. Este desenho foi optado pela pesquisadora por ficar mais próximo da condição humana.

O delineamento dos grupos e esquema dietético de 2ª a 6ª está exposto no quadro 1.

**Quadro 1** – Desenho dos grupos experimentais.

GRUPOS	8:00H às 12:00H	12:00H às 8:00H
CONTROLE-GC	Dieta comercial <i>ad libitum</i>	Dieta comercial <i>ad libitum</i>
SEM DIETA COMERCIAL-GRC	Sem dieta	Dieta comercial <i>ad libitum</i>
SEM DIETA OCIDENTALIZADA-GRO	Sem dieta	Dieta ocidentalizada <i>ad libitum</i>

### 5.3 DIETAS

As dietas utilizadas no experimento foram a dieta comercial para roedores (figura 1) e a dieta ocidentalizada (figura 2), cuja contribuição energética de cada nutriente para o valor energético total, encontra-se explicitada no quadro 2.



**Figura 1** – Ilustração da dieta comercial, Fonte: A autora.



**Figura 2** – Ilustração da dieta ocidentalizada, Fonte: A autora.

**Quadro 2** – Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) das dietas comercial e ocidentalizada, baseadas na AIN-93G para roedores.

DIETAS*	PROTEÍNA (% Kcal VET)	CARBOIDRATO (% Kcal VET)	LIPÍDIO (% Kcal VET)	VET (Kcal/g)
Comercial	23,0	63,0	11,0	3,6
Ocidentalizada (Crescimento)	19,0	44,0	37,0	4,1
Ocidentalizada (Manutenção)	15,0	50,0	35,0	4,0

\*Os cálculos da composição centesimal foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO).

A dieta ocidentalizada de crescimento foi utilizada dos 45 aos 60 dias de vida das ratas. Após esse período elas passaram a receber a dieta ocidentalizada de manutenção (dos 60 aos 170 dias).

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO PONDERAL

A aferição do peso corporal foi realizada semanalmente (sempre no mesmo dia da semana - quarta-feira), iniciando a partir da terceira semana de vida até o final do experimento. O horário determinado foi entre 7h30min e 8h00min. O peso corporal foi registrado em balança Marte Scale (AS1000) com divisória de 0,01g.

## 5.5 CONSUMO ALIMENTAR

O consumo alimentar foi avaliado diariamente, de segunda à sexta-feira, a partir de 45 dias de vida, onde foi oferecida uma cota diária de 30-40g de ração (em pellets) e sua ingestão, medida entre a cota oferecida e a quantidade restante após 20 horas.

## 5.6 PADRÃO CIRCADIANO DO CONSUMO ALIMENTAR E GLICEMIA

O ritmo da alimentação e a glicemia durante o período escuro foram medidos a cada 4 horas, em função da dieta e alteração da disponibilidade de alimento. O padrão de ingestão da alimentação, onde a dieta era pesada para verificar a quantidade consumida pelas ratas, na fase escura (a cada 4 horas) e clara do ciclo (contabilizado o ingerido em 12 horas) foi realizado durante 5 dias. A dosagem da glicemia na fase escura foi realizada uma única vez durante o estudo, aos 100 dias de vida ( $\pm 2$ ).

## 5.7 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TOTG)

O teste de tolerância oral à glicose foi realizado aos 120 ( $\pm 2$ ) dias de vida. O animal foi submetido a um jejum de 6 horas durante a fase escura do ciclo (entre 8:00 e 14:00 horas), e após esse período foi obtida amostra de sangue da cauda dos animais, onde a primeira amostra de sangue (tempo 0) para dosagem da glicose basal foi às 14:00h. Posteriormente, foi administrada por gavagem uma solução de glicose a 50%, na dosagem de 2mg/g de peso do animal para o teste e a glicemia mensurada nos tempos 30, 60, 90 e 120min (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION – ADA, 2010; SIEVENPIPER et al., 2000).

## 5.8 AVALIAÇÕES POST MORTEN

Ao final do experimento, foi realizada a eutanásia por excesso de anestésico (Ketamina, 40mg/kg e Xilazina, 5mg/kg) com fins de proceder a coleta das amostras de sangue destinadas às dosagens bioquímicas, bem como a retirada de tecidos e órgãos úmidos (estômago e fígado) para serem pesados em balança eletrônica digital, marca Marte (modelo ASF11).



### 5.8.1 Avaliação Bioquímica de glicose e lipídios

Para a determinação das dosagens bioquímicas, foram colhidas amostras de sangue, após um período de 12 horas de jejum, no início da manhã, em tubos sem aditivos, seguido de retração de coágulo e separação imediata de soro. Após a coleta, o sangue foi centrifugado e depositado em recipientes fechados (Eppendorf) e armazenados a -20°C até o momento de realização das dosagens.

Para determinar as dosagens de glicemia de jejum, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos, creatinina, ácido úrico, ureia, TGO (transaminase glutâmica oxalacética), TGP (transaminase glutâmica pirúvica) e fosfatase alcalina, foram utilizados os Kits de reagente da marca BIOSYSTEMS, assim como sua metodologia, através de um equipamento automatizado – A15 Clinical Chemistry Analyzer (Biosystems®, Espanha).

A equação de Friedewald (Friedewald, 1972) foi usada para estimar o nível plasmático de LDL-colesterol e VLDL-colesterol, através das concentrações plasmáticas realizadas de colesterol total, HDL-colesterol e VLDL-colesterol (estimada a partir da concentração dos triglicerídeos), através do cálculo indireto usando a fórmula:  $\text{LDL-colesterol mg/dL} = \text{Colesterol total} - \text{HDL-colesterol} - (\text{Triglicerídeos}/5)$ .

### 5.8.2 Histologia hepática

Os procedimentos histopatológicos foram realizados conforme as técnicas de rotina descritas pela literatura (BEÇAK; PAULETE, 1976; SCHMITT, 1992). O fígado foi dissecado, seccionado e fixado em solução neutra de formalina a 10% (v/v) tamponada. Posteriormente, este órgão foi desidratado, diafanizado e os cortes obtidos na espessura de aproximadamente 4 µm, foram montados em Entellan e fotografados em Microscópio óptico de luz Olympus BX-50.

### 5.8.3 Peso dos órgãos úmidos

Após a exsanguinação e aberta a cavidade abdominal, foram retirados a gordura da região abdominal, retroperitoneal e periovariana, servindo de parâmetro para avaliação das reservas de gordura visceral, e o fígado e o estômago. Todos foram pesados em balança digital com sensibilidade de 0,001g.

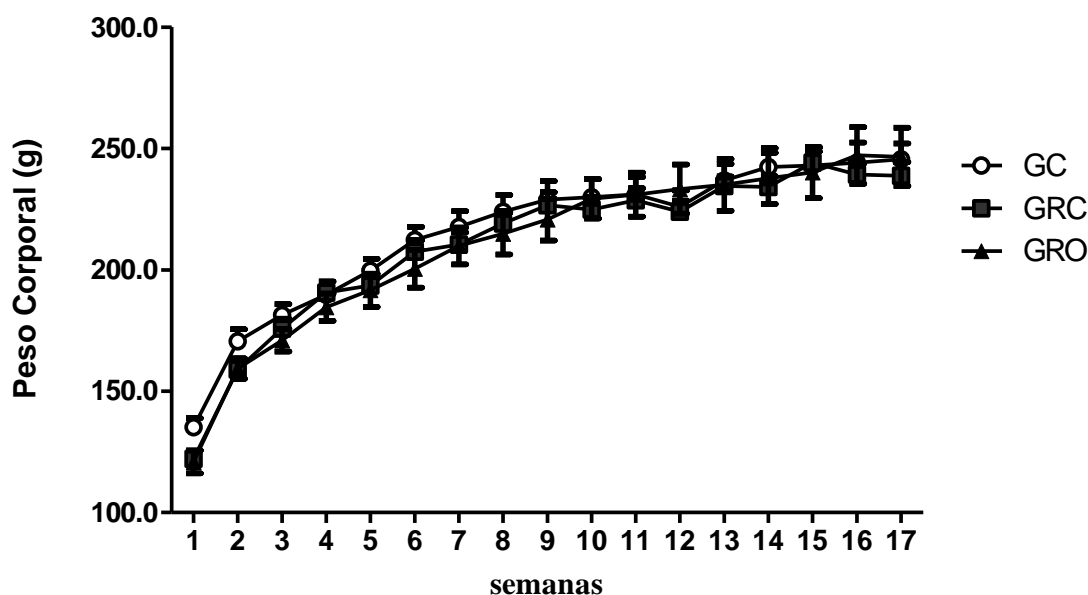
## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para fins estatísticos foram utilizados o teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov e Análise de Variância (ANOVA) *one way* ou *two way* conforme as variáveis estudadas nos múltiplos grupos, seguidos do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância estabelecido é de 5%. Os dados expressos em média e erro padrão da média, foram analisados no GraphPad® versão 5.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

## 7 RESULTADOS

Um número inicial de 30 Ratas *Wistar* com 45 dias de vida ( $\pm 1$ d) e com peso médio de 125g ( $\pm 14$ g) foram obtidas do Biotério de criação do Departamento de Nutrição, e um total de 28 ratas chegaram ao final do período experimental. As ratas foram acompanhadas até 170 dias ( $\pm 2$ d) de vida. O peso corporal foi mensurado semanalmente até o final do experimento e no dia do sacrifício.

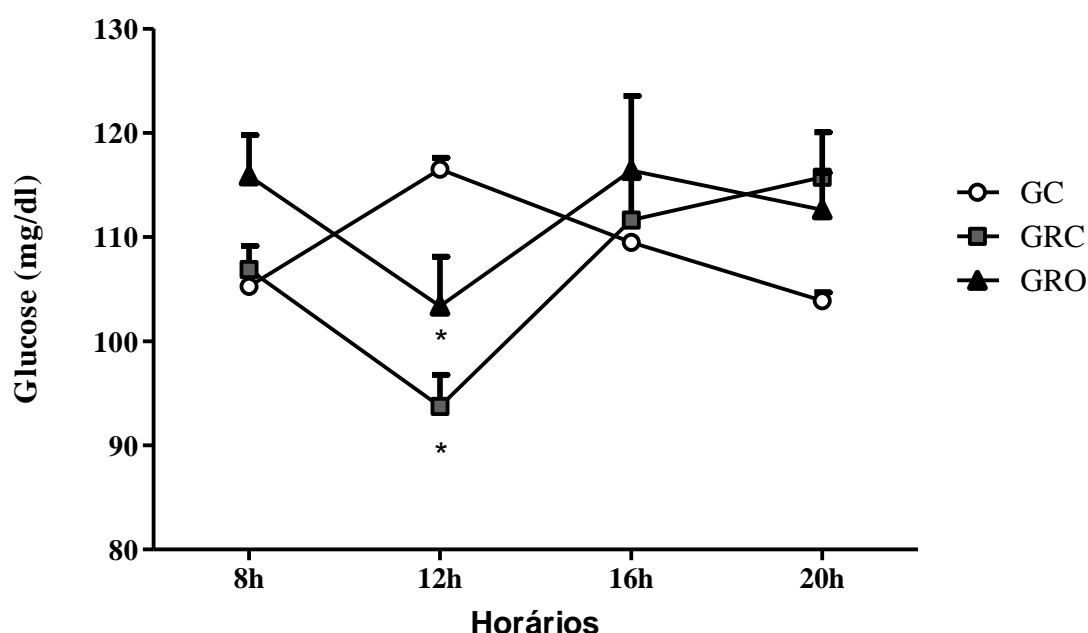
Na Figura 3, o teste estatístico *two way RM ANOVA* seguido do pós-teste de Bonferroni não detectou diferenças na massa corporal das ratas alimentadas com dieta comercial em função da ausência de alimento nas primeiras 4 horas da fase escura quando seguida ou de dieta comercial ou de dieta ocidentalizada em todas as semanas de observação, sem diferenças em todo o período até a 17ª semana (GC=245,5 $\pm$ 7,4; GRC=238,7 $\pm$  4,0; GRO=246,6 $\pm$ 12,0;  $p=0,07$ ).



**Figura 3 – Evolução do peso corporal (g) das fêmeas durante o período experimental.** Valores expressos em média  $\pm$ EPM. Grupos: GC= grupo controle, dieta comercial; GRC= grupo restrito, dieta comercial. GRO= grupo restrito, dieta ocidentalizada. (N= 8-10 animais por grupo). Teste *two way RM ANOVA*.

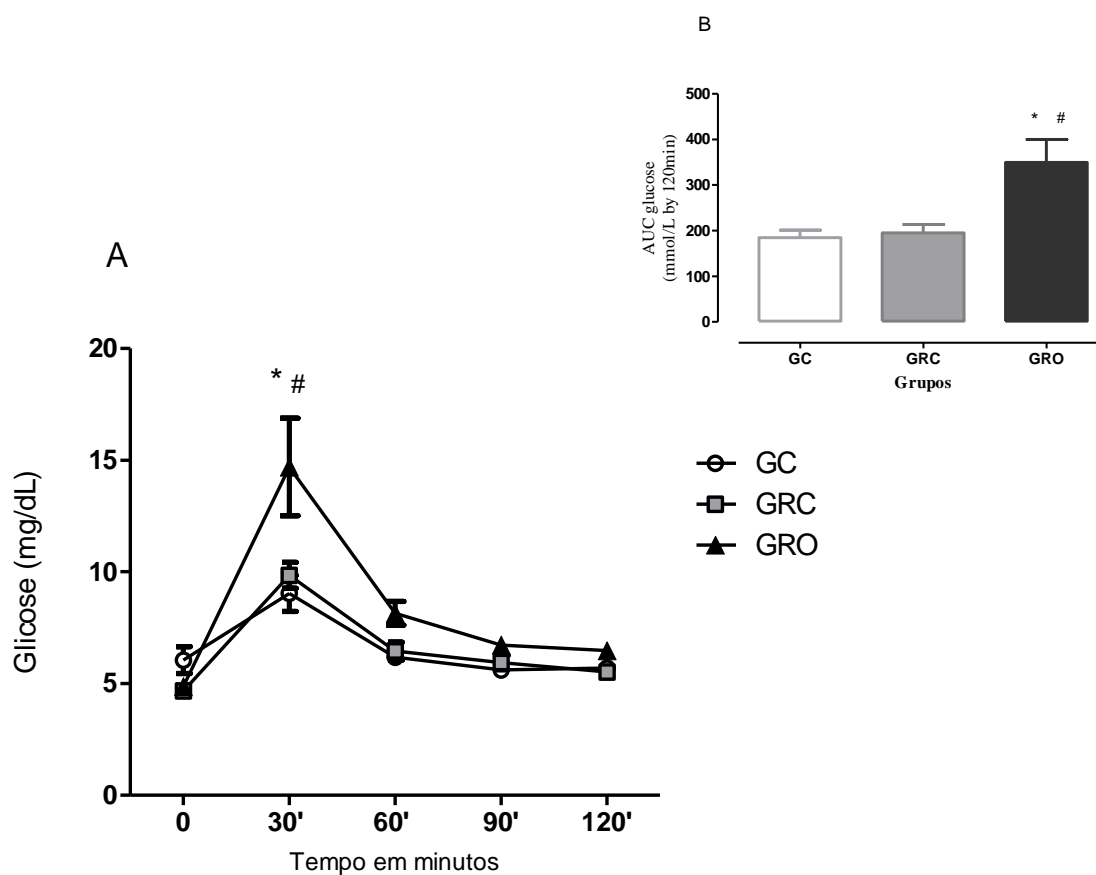
Aos 100 dias ( $\pm 2$  dias) de vida foi realizado nos 3 grupos a dosagem de glicose a cada 4 horas no ciclo escuro, por um período de 12 horas (Figura 4). A glicemia foi avaliada por meio de fitas reagentes (ACCU-CHEK Performa, Roche) acopladas a um

glicosímetro digital portátil. O teste estatístico demonstrou que os grupos GRC e GRO apresentaram menor glicemia às 12 horas em relação ao grupo GC (GC=116,5 ± 3,1; GRC=93,8 ± 8,6; GRO=103,4 ± 13,4 mg/dL,  $p=0,015$ ). Às 16 horas, observou-se que os animais alimentados com dieta ocidentalizada apresentaram a maior concentração de glicose com relação aos grupos que receberam dieta comercial, independente de restrição alimentar ou não, porém não houve diferença estatística.



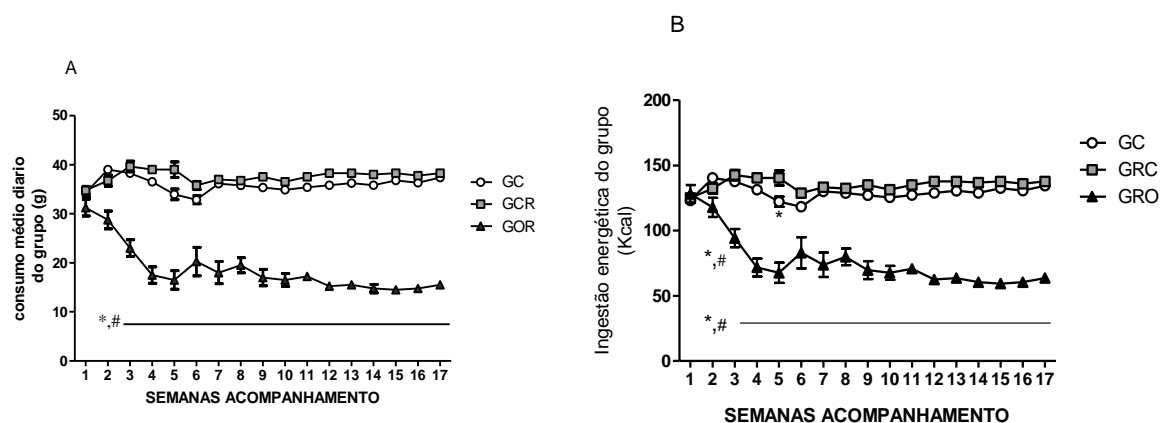
**Figura 4 – Glicemia realizada na fase escura, a cada 4 horas por um período de 12 horas.** Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC= grupo restrito, dieta comercial; GRO= grupo restrito, dieta ocidentalizada. N= 8-10 animais por grupo. Valores expressos em média ± EPM. \*Estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste *two-way RM ANOVA*, seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $p<0,05$  vs GC).

A Figura 5 mostra a resposta glicêmica referente ao Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e a área sob a curva dos grupos de estudo aos 120 dias de vida, na fase escura. Por meio deste teste, foi possível observar um aumento significativo da glicose do GRO em relação ao GRC e ao GC aos 30 minutos (A) e na área sob a curva (B). Na fase escura do ciclo o TOTG mostrou que a glicose do GRO apresentou uma elevação significativa com relação ao GC e GRC 30 minutos após a ingestão de glicose.



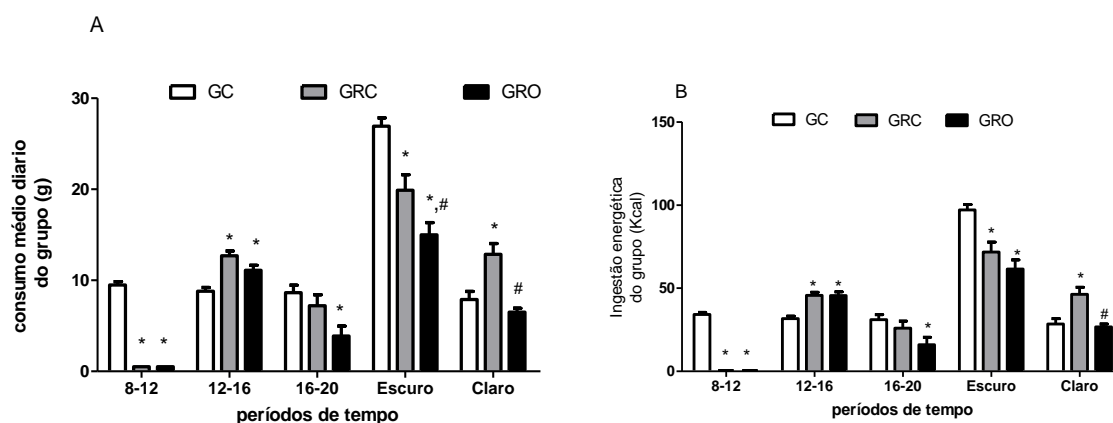
**Figura 5 – Teste oral de tolerância à glicose (A) e área sob a curva (B) realizado aos 120 dias de vida.** Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC= grupo restrito, dieta comercial. GRO= grupo restrito, dieta ocidentalizada (N = 8-10 animais por grupo). Teste *two-way RM ANOVA*, seguido do pós-teste de Bonferroni. \*vs GC, #vs GRC p<0,05.

Na Figura 6(A) está demonstrado o consumo médio diário (g) de cada grupo e na figura 6B a ingestão energética segundo as semanas de acompanhamento. Na primeira semana os 3 grupos tiveram o mesmo consumo, a partir da segunda semana o consumo do GRO diminuiu significativamente com relação ao GC e ao GRC até a quarta semana, e depois se estabilizou até o final do experimento (17ª semana). A figura 6(B) mostra que o aumento de 14% na densidade energética da dieta não foi suficiente para igualar a ingestão calórica com os grupos com dieta comercial, visto que a redução da ingestão do grupo GRO variou de -10% na primeira semana a -60% do consumo do GC na 17ª semana.



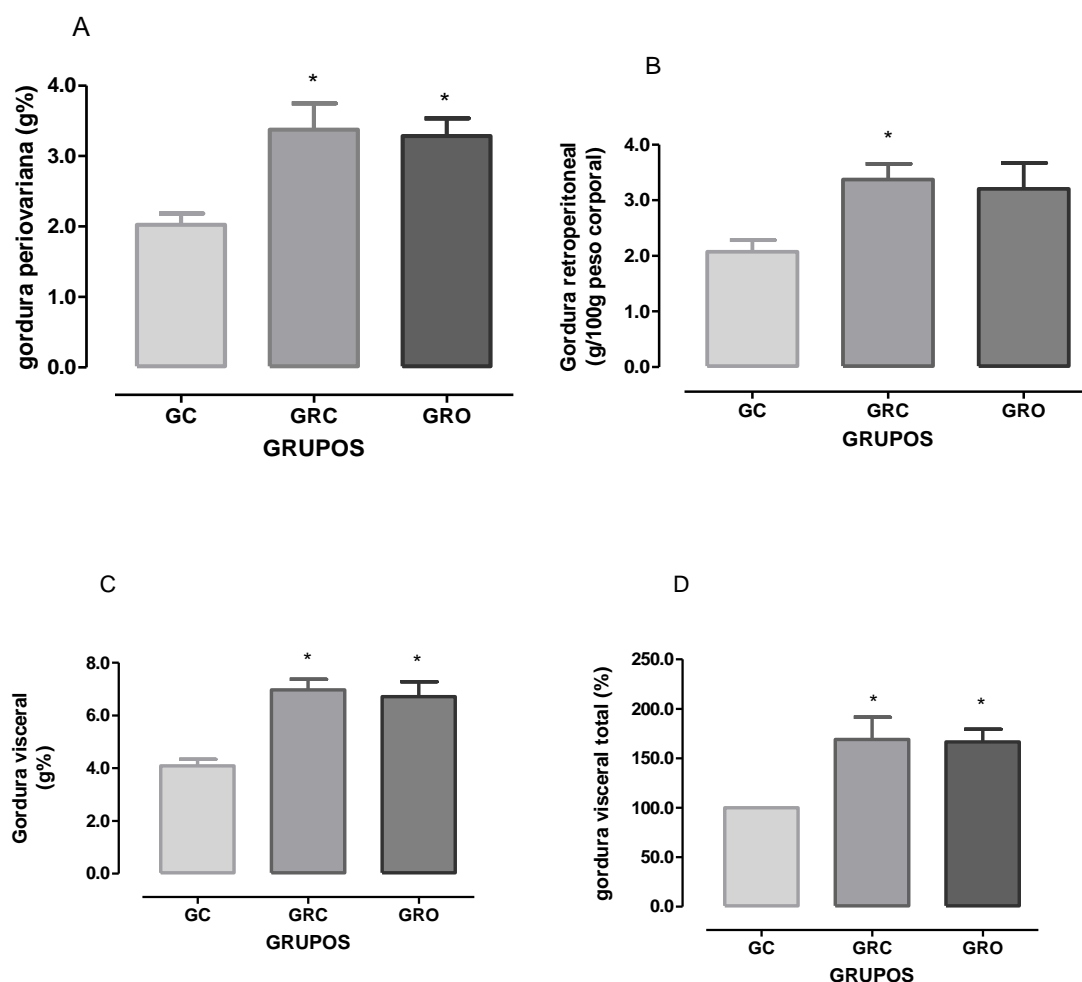
**Figura 6 – Média de consumo diário por gaiola (2 animais cada).** Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC= grupo restrito, dieta comercial; GRO = grupo restrito, dieta ocidentalizada. N= 8 animais por grupo. Valores expressos em média  $\pm$  DP. Teste *two-way* RM ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. \*\* $p < 0,05$  vs GC, #  $P < 0,05$  vs GRC  $p < 0,05$ .

No acompanhamento da ingestão de alimentos a cada 4 horas da fase escura e a totalidade da ingestão na fase clara (de 20:00 às 8:00 horas) observou-se que: no horário de 8:00 às 12:00 horas, houve diferença significativa dos grupos GRC e GRO em relação ao grupo GC. Assim, de 12:00 às 16:00 horas houve um aumento na quantidade (A) e na energia no grupo GRC e GRO vs GC (B). Este aumento deve-se à restrição alimentar imposta e demonstra uma hiperfagia em ambos os grupos consumindo em média cerca de 50% a mais neste intervalo. Em adição, houveram diferenças entre GRO e GRC no total consumido nas fases clara e escura (A); sendo a menor quantidade ingerida pelo GRO comparado ao GRC. Quando se compara o total ingerido pelo GRC nas fases clara e escura parece haver uma compensação. Este grupo demonstrou maior ingestão na totalidade da fase clara, levando este grupo a ingerir quantitativamente e caloricamente igual ao GC durante o ciclo 24 horas e por todo o período experimental. O mesmo não foi observado no grupo GRO. A avaliação da ingestão energética revelou que GRO vs GC só diferem na totalidade de alimento ingerido no período claro do ciclo. E que o GRO só ingere mais calorias que o GC; no horário de 12-16h (figura 7B).



**Figura 7** – Média de consumo de alimento (A) e de energia (B) diária por gaiola (2 animais cada) a cada 4 horas na fase escura, na totalidade da fase escura e na totalidade da fase clara. Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC= grupo restrito, dieta comercial; GRO = grupo restrito, dieta ocidentalizada. N= 8 animais por grupo. Valores expressos em média  $\pm$  DP. Teste *two-way* RM ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs GC, # $p < 0,05$  vs GRC.

Na figura 8, foi observado aumento da gordura (g/%) tanto periovariana nos grupos GRC e GRO (A) (GRC= $3,37 \pm 0,37$ g% e GRO= $3,29 \pm 0,25$ g%, GC= $2,01 \pm 0,16$ g%,  $p < 0,00$ ) quanto retroperitoneal (GRC= $3,37 \pm 0,28$ g%,  $p = 0,01$ ) para o grupo GRC (B), bem como na visceral total (C) (GC= $4,09 \pm 0,24$ ; GRC= $6,97 \pm 0,40$ % e GRO= $6,71 \pm 0,56$ g%,  $p < 0,00$ ). Ao considerar a gordura do GC como 100%, observou-se um aumento médio de 50% de gordura abdominal total dos grupos restritos comparado ao controle (D). Este resultado mostra-se bastante curioso, pois denota que mesmo sem diferenças na massa corporal, a ausência de alimento nas primeiras 4 horas do início da fase escura do ciclo das ratas causou acentuado depósito de gordura na região abdominal. As diferenças na gordura total foram significativas entre os restritos (GRC E GRO) com relação ao grupo controle (GC), mas, entre os grupos restritos não diferem entre si.



**Figura 8 – Aumento de tecido adiposo abdominal total, periovariano e retroperitoneal.** Grupos: GC = grupo controle, dieta comercial; GRC = grupo restrito, dieta comercial; GRO = grupo restrito, dieta ocidentalizada. N = 8-10 animais por grupo. \*Estatisticamente diferentes do grupo controle. Teste estatístico: “t” de Student (\*p < 0,05).

Foi obtido também o peso do fígado e do estômago desses animais e verificou-se que o grupo GRO apresentou maior peso úmido do fígado (GC= 3,12±0,26; GRC= 2,85 ±0,26; GRO= 2,72±0,14g%, P=0,009) e nenhuma diferença foi encontrada no peso do estômago (GC= 0,62 ±0,08; GRC= 0,62 ±0,05; GRO= 0,56 ±0,04g%, P=0,106).

As taxas bioquímicas não foram alteradas em função da restrição energética no grupo que ingeriu dieta comercial. No entanto, ocorreram diversas alterações nos valores séricos no grupo que se alimentou de dieta ocidentalizada. Os níveis de



glicose sanguínea apresentaram-se maiores nos animais que receberam dieta ocidentalizada (GRO) com relação ao grupo controle (GC) e ao grupo restrito controle (GRC). Por outro lado, a ingestão de dieta ocidentalizada com restrição nas primeiras 4 horas da fase escura diminuiu os níveis de triglicerídeos, HDL-c e VLDL-c e aumentou o LDL-c de ratas, quando comparado aos grupos que receberam dieta comercial e o comercial com restrição.

Com relação às enzimas e produtos do metabolismo, foram observadas diferenças significativas apenas sobre a TGP, que se mostrou menor nos animais que receberam dieta ocidentalizada (GRO) com relação ao grupo controle (GC) e ao grupo restrito controle (GRC), e sobre a Ureia que se mostrou menor nos animais que receberam dieta ocidentalizada (GRO) com relação ao grupo controle (GC).

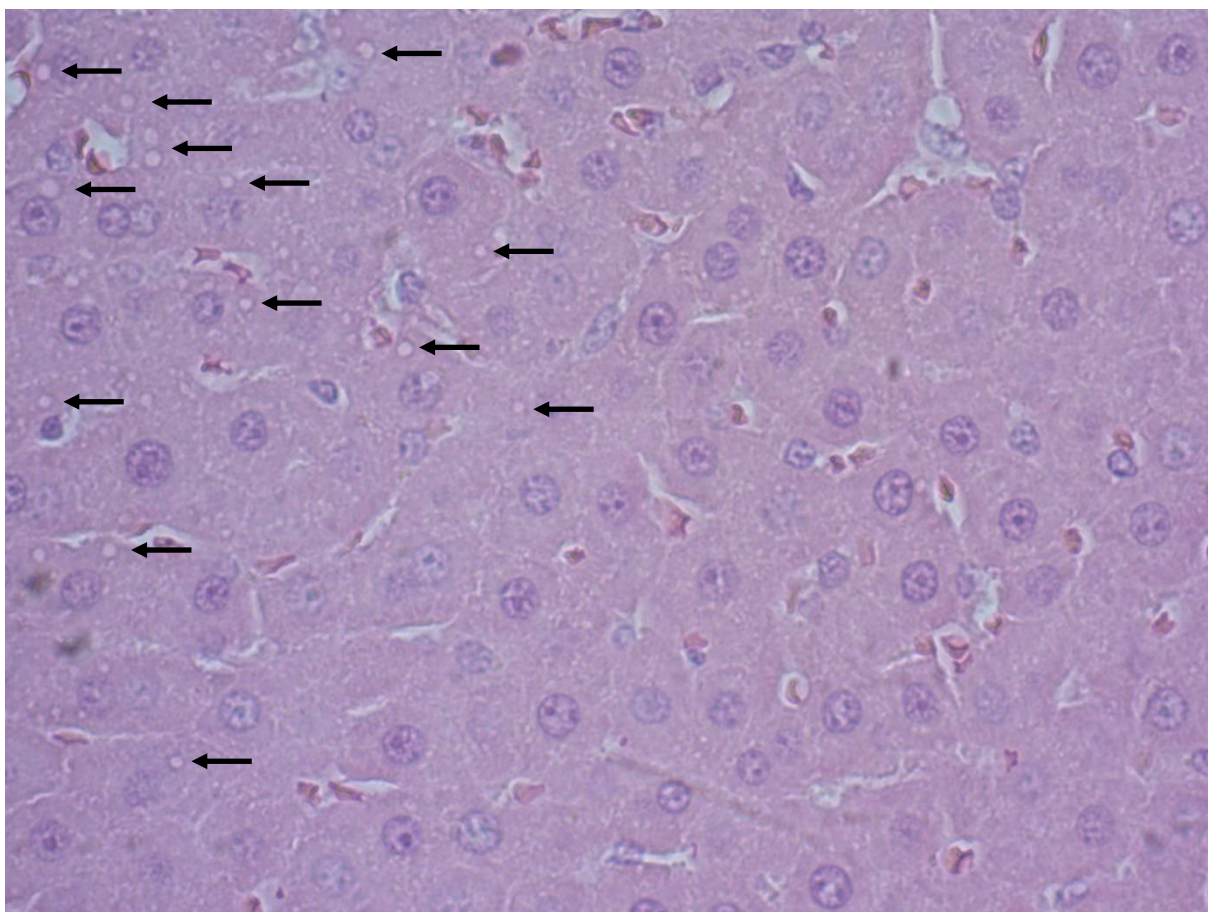
**Tabela 2** – Efeito da dieta sobre os parâmetros bioquímicos de ratas.

GRUPOS	GC	GRC	GRO
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
<b>Variáveis sanguíneas</b>			
Glicose (mmol/L)	145,8 ± 39,19	163,4 ± 32,93	<b>240,0 ± 73,93*#</b>
Triglicerídeos (mg/dL)	65,41 ± 12,00	57,86 ± 7,48	<b>44,57 ± 10,47*</b>
Colesterol total (mg/dL)	66,64 ± 8,16	60,14 ± 9,62	67,43 ± 12,00
HDL-c (mg/dL)	34,79 ± 2,63	31,54 ± 3,15	<b>26,87 ± 4,99*</b>
LDL-c (mg/dL)	19,57 ± 5,85	20,50 ± 3,62	<b>31,64 ± 9,93*#</b>
VLDL-c (mg/dL)	13,14 ± 2,41	11,50 ± 1,69	<b>8,91 ± 2,09*</b>
TGO (UI/L)	206,60 ± 66,31	157,30 ± 49,00	155,00 ± 63,52
TGP (UI/L)	66,29 ± 11,20	62,88 ± 12,40	<b>32,14 ± 6,91*#</b>
Creatinina (mg/dL)	0,71 ± 0,12	0,65 ± 0,07	0,74 ± 0,03
Ácido Úrico (mg/dL)	2,77 ± 0,52	3,12 ± 0,91	3,81 ± 0,94
Ureia (mg/dL)	50,00 ± 7,11	44,03 ± 10,83	<b>32,29 ± 4,60*</b>

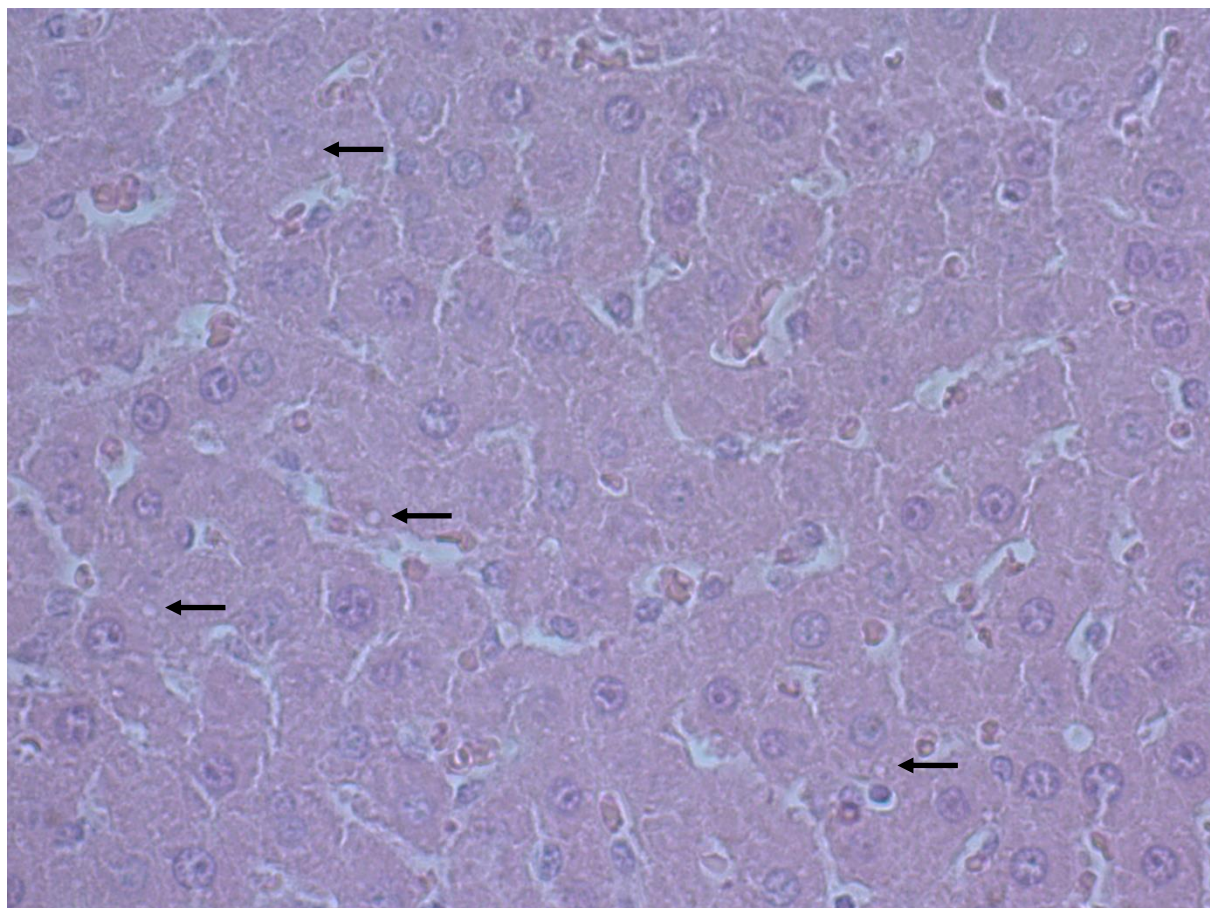
Grupos: GC (Grupo controle). GRC (Grupo restrito controle). GRO (Grupo restrito ocidentalizada). Os valores representam a média ± E.P.M, (n= 8-10 animais por grupo). \*Estatisticamente diferentes do grupo controle. #Estatisticamente diferentes do grupo restrito controle. \*vs GC; # GRO vs GRC (ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni, p< 0,05).

O estudo histológico não mostrou nenhuma diferença estrutural entre os grupos. No entanto, apesar da preservação da estrutura hepática, o grupo GC (9A) apresenta pequeno acúmulo de lipídios (sinalizado pelas setas pretas). No grupo GRC

(9B) observamos a menor quantidade de gordura e ausência de processo inflamatório e o grupo GRO (9C) foi o que apresentou maior acúmulo de lipídios e indícios inflamatórios entre os três grupos. Com relação à dieta e suas consequências sobre o fígado podemos sugerir que a dieta Presence®, usada pelo GC (Figura 9A), pode não ser muito adequada pois pode gerar certo grau de esteatose hepática, e que a dieta ocidentalizada promove intenso acúmulo de gordura e inflamação hepática.



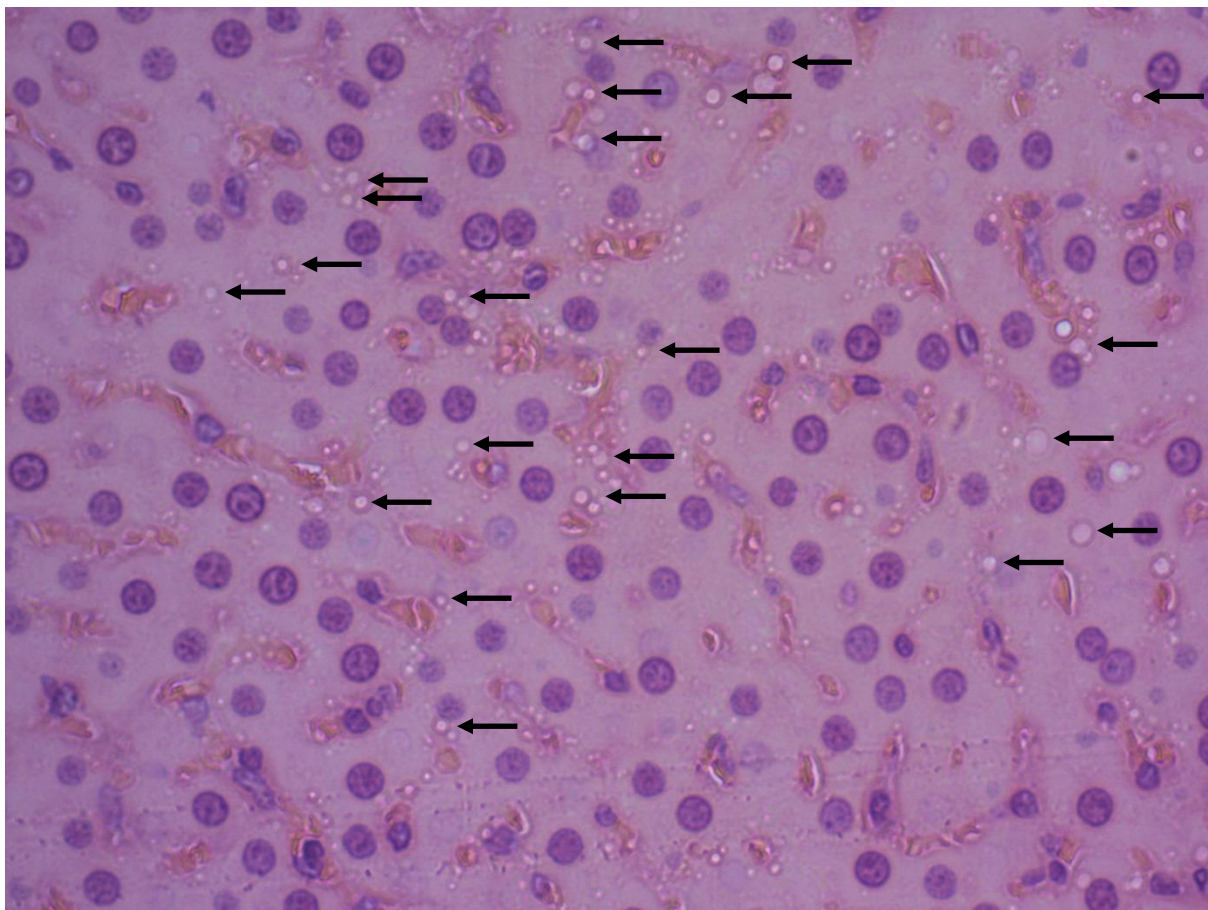
**Figura 9A – Histologia Hepática do GC (Grupo controle, dieta comercial)**



**Figura 9B – Histologia Hepática do GRC (Grupo restrito, dieta comercial)**



A figura 9C representa a histologia hepática do GRO. Nesse grupo encontramos o maior acúmulo de lipídios entre os 3 grupos (sinalizado pelas setas pretas).



**Figura 9C – Histologia Hepática do GRO (Grupo restrito, dieta ocidentalizada)**

**Figura 9** – Fotomicrografias do fígado de ratas submetidas ou não a restrição alimentar de 4 horas na fase escura do ciclo. Gotículas de lipídios evidentes sinalizadas pelas setas pretas (A), com mínima concentração de gordura (B) e evidente acúmulo de gordura caracterizando esteatose hepática e locais de infiltrado linfocitário (C). Todos os grupos apresentaram arquitetura hepática conservada. Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE).

## 8 DISCUSSÃO

Ingestão e comportamento alimentar são condições que envolvem estímulos externos e endógenos. O ritmo da alimentação é um ritmo biológico regulado por fatores endógenos ancorados pelos genes osciladores circadianos (MARKUS RP et al., 2003) bem como, influenciados por fatores externos como a luz, a alimentação e outras condições comportamentais (FONKEN et al., 2010). Neste estudo, utilizamos um modelo experimental de privação de alimento em fêmeas durante as primeiras 4 horas do período escuro, que corresponde ao momento de grande ingestão de alimento e elevada atividade nesses animais (ELLACOTT KL et al., 2010). Para verificar se a composição da dieta após a privação influenciava diferentemente os aspectos fisiológicos e metabólicos elegíveis, ofertamos duas dietas distintas, uma comercial, padrão para roedores, e outra ocidentalizada, já utilizada em outros estudos do grupo de pesquisa (FERRO CAVALCANTE et al., 2013).

O estudo demonstrou que a privação, independente da composição da dieta ofertada a seguir, não modificou o peso corporal, mas causou acúmulo de gordura na região abdominal em ambos os grupos restritos. O ritmo da glicemia foi alterado em apenas um horário da fase escura do ciclo em função da privação imposta, mas a tolerância à glicose e os níveis bioquímicos foram alterados apenas em função da composição da dieta após a restrição. Foi observada também uma hiperfagia a seguir as horas de privação em ambos os grupos restritos, mas não houve aumento da quantidade de alimentos ingeridos ao longo de 24 horas nos grupos privados.

A ausência de diferença de peso corporal nos grupos restritos mostrou-se independente da dieta a seguir à restrição. O estudo de CHAIX A et al. (2014), com restrição de alimentos, demonstrou semelhança com a nossa pesquisa, onde houve ausência no ganho de peso corporal em ratos alimentados com dieta rica em gordura quando comparados aos ratos que se alimentaram de maneira *ad libitum*.

A restrição de alimento em camundongos machos durante 15 horas do período claro do ciclo seguidos de 2 dias *ad libitum* com dieta rica em gordura restringia o ganho de peso quando comparados ao grupo alimentado sem restrição (OLSEN et al., 2017). Apesar das diferenças metodológicas, este resultado se assemelha ao deste estudo visto que o grupo alimentado com dieta rica em gordura após privação de 4 horas não mostrou peso corporal acima dos grupos alimentados com dieta

comercial. No entanto, é intrigante a detecção de que o grupo alimentado com dieta elevada em gordura ingere menor quantidade de alimento e de energia que o grupo alimentado com dieta comercial tanto do grupo privado quanto do grupo alimentado à vontade. Esta redução situa-se em torno de 50%. Portanto, pode-se inferir que independente do total energético consequências metabólicas mostram-se subjacentes às alterações encontradas. A literatura aponta que o período do dia no qual a maior quantidade de alimento/energia é ingerida interfere na resposta ao ganho de peso, e que esta ingestão mostra-se diretamente associada ao consumo durante o período claro (SALGADO-DELGADO et al., 2010; OLSEN et al., 2017). Como neste estudo não foi observado aumento da ingestão no período claro, podemos sugerir que este fator pode ter sido um dos motivos para que não se observasse diferença no ganho de peso neste grupo.

Por outro lado, o grupo GRC aumentou sua ingestão no período claro e também não mostra diferença em termo de peso corporal total. No entanto, é bom ressaltarmos que não temos a análise da composição corporal para afirmar se houve ou não diferenças no percentual de massa magra e gorda nesses animais. Pois, o grupo GRC mesmo sem diferir do grupo GC, mostrou elevado depósito de gordura na região abdominal. E, curiosamente, o grupo GRO apesar de significativa redução na ingestão/energia também mostra elevados depósitos de gordura abdominal. O aumento de gordura abdominal em ambos os grupos restritos sem aumento da ingestão e/ou energia, pode estar associado à hiperfagia a seguir ao período de restrição favorecendo a expressão de genes associados ao aumento da lipogênese e redução da termogênese modificando tamanho de adipócitos e quantidade de gordura gonadal (KLIEWER et al., 2015). O estudo de Kliewer et al. (2015) demonstrou que, além de esteatose hepática, o aumento do acúmulo de gordura abdominal é resultado da realimentação após a restrição alimentar, corroborando com o nosso estudo, onde o grupo GRO também apresentou esses achados.

A partir do acompanhamento da ingestão durante as 17 semanas do estudo, observa-se que o GRO mostra acentuada redução global na ingestão alimentar e energética comparada aos demais grupos, GC e GRC. O controle da ingestão de alimentos envolve a expressão de diversos neuropeptídeos orexígenos, a exemplo do NPY e o peptídeo relacionado ao gene Agouti (AgRP) e anorexígenos como o pró-opio melanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à anfetamina e à cocaína

(CART) (BRADY LS et al., 1990; GRILL HJ, 2006), bem como fatores endócrinos intestinais e uma variedade de hormônios regulatórios relacionadas à alimentação, dentre eles estão a grelina (orexígeno) e a insulina (MURRAY S et al, 2014). Em adição, existem os sinais provenientes do tecido adiposo a exemplo da secreção de leptina (DAMIANI D, DAMIANI D, 2011) que reduz a ingestão de alimentos e estimula o gasto energético. Em conjunto estes sinais contribuem para a redução da ingestão de alimentos observada no grupo GRO.

A colecistocinina (CCK) é um hormônio que contribui para a sensação de saciedade pós-prandial, liberado em resposta à presença de nutrientes no intestino, sobretudo, os lipídios e as proteínas (PIMENTEL GD et al., 2010). A dieta ocidentalizada é caracterizada por apresentar um elevado teor de lipídios saturados (FERRO-CAVALCANTE et al., 2014) e vários autores defendem a ideia de que as gorduras são um potente estímulo para a liberação de CCK (FELTRIN KL et al., 2004, MALJAARS J et al., 2009). Este fator sugere que a redução da ingestão alimentar das ratas do grupo GRO em parte está relacionada com a maior liberação da CCK regulando a saciação em nível de SNC via aferentes vagais e fatores humorais (WOODS SC, 2009). A influência da composição da dieta sobre a ingestão e o comportamento alimentar também foi observado em animais quando expostos de forma aguda a uma dieta hiperlipídica onde ocorreu um aumento na quantidade ingerida por refeição e redução na frequência da refeição indicando tanto consumo mais rápido da refeição quanto redução da saciedade (MELHORN et al, 2010).

A glicemia realizada na fase escura apresentou-se nos grupos restritos, responsiva à restrição da alimentação, bem como, a realimentação a seguir à privação. Assim, após 4 horas de privação se observou reduzida glicemia nos grupos GRC e GRO e restauração da glicemia após alimentação. O controle glicêmico é exercido por diversos mecanismos, dentre eles a expressão de genes osciladores circadianos como CLOCK e BMAL (YOUNG e BRAIN, 2007), e a regulação hepática a partir das vias glicogênicas e neoglicogênicas que envolvem a estimulação do sistema nervoso autônomo, bem como, o controle circadiano (KALSBECK A, FLEUR SL, FLIERS E, 2014).

A homeostase da glicose é alcançada pela sutil regulação hormonal da absorção de glicose e da produção endógena de glicose. A insulina é o principal

regulador da absorção de glicose no estado alimentado, enquanto o glucagon e outros hormônios contra-regulatórios são importantes na manutenção dos níveis de glicose no sangue durante o jejum (BEARDSALL et al., 2006). Contudo, o sistema circadiano localizado no núcleo supraquiasmático contribui para a captação de glicose e sensibilidade à insulina (LA FLEUR SE, KALSBECK A, WORTEL J, FEKKES ML, BUIJS R, 2001) e age de forma independente dos controles periféricos (MARCHEVA B, RAMSEY KM, BUHR ED, KOBAYASHI Y et al., 2010; SADACCA LA, LAMIA KA, De LEMOS AS, BLUM B, WEITZ CJ, 2011). Estudos prévios têm demonstrado evidente participação dos genes osciladores controlando a homeostase glicêmica. Inativação do gene BMAL1 suprime a variação da glicose em 24 horas e pode desenvolver intolerância à glicose e resistência à insulina (RUDIC RD, Mc NAMARA P et al, 2004), enquanto camundongos mutantes para o gene CLOCK mostram sinais de doenças metabólicas incluindo hiperglicemia e hipoinsulinemia. Por outro lado, uma deleção tecido-específica de BMAL1 no fígado leva à abolição da expressão rítmica de genes reguladores da glicose hepática (LAMIA KA, STORCH KF, WEITZ CJ, 2008) e no pâncreas promove elevados níveis de glicose durante o dia e prejudica a tolerância à glicose e diminuição da secreção de insulina (SADACCA LA, LAMIA KA, De LEMOS AS, BLUM B, WEITZ CJ, 2011).

Em conjunto, esses resultados mostram a importância dos genes osciladores circadianos no controle glicêmico. Ademais, os *clocks* dos tecidos periféricos são arrastados por períodos de jejum e alimentação. Assim, mudanças no tempo de se alimentar, quantidade, ou ainda, composição da dieta, podem interferir ou romper a função normal dos genes osciladores relacionados com a homeostase energética, principalmente o metabolismo glicídico e lipídico.

Neste estudo, além da alteração glicêmica causada pelo jejum de 4 horas, observamos elevada glicemia de jejum nos grupos GRC e GRO e alteração da tolerância à glicose no grupo GRO. Estes resultados nos permitem inferir que a composição da dieta exerceu forte influência nas alterações mencionadas corroborando com diversos autores que defendem a influência dos nutrientes sobre a expressão de genes osciladores responsáveis pelo metabolismo energético, glicídico e lipídico. Apesar de não termos dados mais consistentes para diagnosticar quadro de diabetes, podemos afirmar que a hiperglicemia, a intolerância e a maior área sob



a curva são fortes indícios de distúrbio no metabolismo glicídico e de provável instalação de quadros patológicos.

Ressaltamos que possivelmente ocorre uma interação entre composição dietética e genes osciladores visto que, ao contrário de alguns estudos, nossos animais não ingerem maiores quantidades de energia. Em estudo com células (fibroblastos) foi demonstrado a influência da glicose sobre a expressão de Per1 e Per2 e provável ruptura da sincronização gênica (HIROTA T et al, 2002). De forma mais recente, também em cultura com células nervosas (hipotalâmicas), foi demonstrado que a presença de glicose altera a expressão de Per2 levando a desordens metabólicas (OOSTERMAN JE, BELSHAM DD, 2016).

Estudo prévio utilizando variadas dietas de estilo ocidental, mas com teor energético similar e fontes alimentares diversas, observou que as respostas ou consequências fisiológicas e metabólicas variam em função do ingrediente ou nutriente presente na dieta (FORBES JM et al, 2013). Outra possível evidência da interação da dieta ocidentalizada na ruptura do ritmo circadiano ocorreu a partir de avaliação na microbiota intestinal de camundongos deixados em livre curso (escuro constante) que apresentavam alterações na atividade locomotora (REFINETTI R, 2017).

Neste estudo podemos afirmar que a privação de alimento nas primeiras 4 horas da fase escura do ciclo não promoveu mudanças nos parâmetros bioquímicos avaliados. Contudo, a dieta exerceu importante influência causando relevante hiperglicemia, alteração da LDL-c e HDL-c, mas sem alteração em triglicérides e colesterol. É comum encontrar na literatura que ingestão excessiva de gordura em longo prazo, propicia o desenvolvimento de dislipidemias (WOODS SC et al., 2003). A ingestão de uma dieta rica em gordura promove o aumento da absorção de colesterol dietético no intestino delgado, ocasionando um aumento da glicação de LDL-c, diminuindo assim o seu processo catabólico e o funcionamento do receptor de LDL-c hepático (PROJETTO, 2005).

No entanto, as repercussões lipêmicas do excesso de gordura em dietas experimentais não são unânimes entre os estudos (JACOB et al, 2013). Essas diferenças podem estar associadas não apenas quanto aos tipos e quantidades de ácidos graxos, mas também, com a contribuição de açúcares simples, a exemplo da sacarose, para o valor energético total.

Por outro lado, o acúmulo de gordura abdominal não parece ter sido influenciado pela dieta e sim pela restrição alimentar de 4 horas na fase escura visto que não houve diferenças entre os grupos GRC e GRO e ambos demonstraram maior acúmulo de gordura que o grupo controle. Este acúmulo abdominal não mostrou em linha aos depósitos de gordura hepática visto que o grupo restrito seguido de dieta comercial mostra menor armazenamento de gordura no fígado que o grupo controle e, o grupo privado seguido de dieta ocidentalizada apresenta elevada concentração de gordura. Segundo Nassar ALS et al. (2014), existe uma relação causal entre a ingestão de dietas ricas em gordura e o desenvolvimento de esteatose hepática. Segundo esses autores, o elevado consumo de gordura saturada pode causar alterações no metabolismo e o desenvolvimento de infiltrações lipídicas no fígado por mecanismo de lipo-apoptose, que é a morte celular programada causada pela exposição ao excesso de ácidos graxos. Este acúmulo de gordura hepática compromete também a metabolização da insulina no fígado podendo levar a um quadro de resistência insulínica e desenvolvimento de diabetes. (BIRKENFELD AL, SHULMAN GI, 2014).

## 9 CONCLUSÕES

A privação de alimento nas primeiras quatro horas do período escuro do ciclo em fêmeas, causou consequências fisio-metabólicas diversas segundo a dieta subsequente. Destaca-se a hiperfagia imediata nos grupos restritos independente da dieta ofertada e, além do acúmulo de gordura na região abdominal mesmo sem aumento de peso corporal ou de ingestão alimentar total. As alterações são repercussões de um metabolismo energético modificado que pode favorecer o desenvolvimento de possíveis patologias, como obesidade, diabetes tipo 2, resistência à insulina e distúrbios do metabolismo lipídico. Uma maior atenção também deve ser dada à dieta consumida, visto que com uma dieta desequilibrada os efeitos adversos são bem mais evidentes.

## Referências

- AHIMA RS, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(8), 327-332, 2000.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. v.33, Supl.1, p.62–69, 2010.
- ALBERGAAS, SIGAL RJ, GOLDFIELD G, PRUD'HOMME D, KENNY GP. Overweight and obese teenagers: why is adolescence a critical period? *Pediatr Obes*. 7: 261-73, 2012.
- ALBERTI KG, ZIMMET P, SHAW J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet*. v.366, n.9491, p.1059-1062, 2005.
- BATISTA FILHO M, RISSIN A. A transição nutricional no Brasil, tendências regionais e temporais. *Cad. Saúde Pública*. 19 (1):5181-5191, 2003.
- BAYOL, SA; SIMBI, BH; STICKLAND, NC. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *The Journal of physiology*, v. 567, n. 3, p. 951-961, 2005.
- BEARDSALL K, YUEN K, WILLIAMS R, DUNGER D. Applied physiology of glucose control. *Current Pediatrics*; 16, 434-438, 2006.
- BEÇAK, W.S. & PAULETE, J. Técnicas de citologia e histopatologia. v1. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.
- BELISIO et al. Métodos cronobiológicos aplicados à neurociência clínica e experimental. In: LANDEIRA-FERNANDEZ J; FUKUSIMA SS. Métodos e neurociência. São Paulo: Manole, p. 1-14, 2012.
- BENTON, DAVID, PEARL Y. PARKER. "Breakfast, blood glucose, and cognition." *The American journal of clinical nutrition* 67.4: 772S-778S, 1998.
- BERNARDI F, CICHELERO C, VITOLO, MR. Comportamento de restrição alimentar e obesidade. *Rev Nutr*, 18:85-93, 2005.
- BETTS JÁ, RICHARDSON JD, CHOWDHURY EA, HOLMAN GD, TSINTZAS K, THOMPSON D. The causal role of breakfast in energy balance and health: a randomized controlled trial in lean adults. *Am J Clin Nutr* 100:539-47, 2014.
- BIRKENFELD AL, SHULMAN GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology*; 59:713–23, 2014.
- BRADY LS et al. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived Rats. *Neuroendocrinology*; 52:441-447, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022 / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2015: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, 2016.

BRAY GA. Medical Consequences of Obesity. JCEM, v.89, n. 6, p. 2583-2589, 2004.

BRAY MS, RATCLIFFE WF, GRENETT MH, BREWER RA, GAMBLE KL, YOUNG ME. Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice. International Journal of Obesity. v.37, n.6, p. 843-852, 2013.

CARRERA-BASTOS P et al. The western diet and lifestyle and diseases of civilization. Clinical Cardiology; 2 15–35, 2011.

CARVALHO MF et al. "Experimental diet based on the foods listed in the Family Budget Survey is more detrimental to growth than to the reflex development of rats." Revista de Nutrição 26.2: 177-196, 2013.

CAVALI MLR, ESCRIVÃO MAMS, BRASILEIRO RS, TADDEI JAAC. Síndrome metabólica: comparação de critérios diagnósticos. J Pediatr. 86: 325-30, 2010.

CAVALCANTE TCF, SILVA JML, SILVA A AM, MUNIZ GS, NETO LMN, SOUZA SL, CASTRO RM, FERRAZ KM, NASCIMENTO E. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. Lipids, v. 48(11), p. 1157-1168, 2013.

CORDAIN L, EATON SB, SEBASTIAN A, et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. Am J Clin Nutr; 81(2):341–354, 2005.

COSTA, L. C. F.; VASCONCELOS, F. A. G; CORSO, A. C. T. Fatores associados ao consumo adequado de frutas e hortaliças em escolares de Santa Catarina, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 28, n. 6, p. 1133-1142, 2012.

CHAIX A et al. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges, Cell Metab. 20 (6); 991–1005, 2014.

CHEN XL, DEAN RG, HAUSMAN GJ. Expression of leptin mRNA and CCAAT-enhancer binding proteins in response to insulin deprivation during preadipocyte differentiation in primary cultures of porcine stromal-vascular cells. Domestic Animal Endocrinology. 17:389-401, 1999.

CRESCENZO R et al. Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. Obesity, v. 16, n. 5, p. 958–964, 2008.

DANIEL DAMIANI, DURVAL DAMIANI. Appetite brain sinalization. Rev Bras Clin Med. São Paulo, 9(2):138-45, 2011.

DE CASTRO, JOHN M. "Circadian rhythms of the spontaneous meal pattern, macronutrient intake, and mood of humans." *Physiology & behavior* 40.4: 437-446, 1986.

DE CASTRO JM. Circadian rhythms os the spontaneous meal patterns, macronutrient intake, and mood of humans. *Physiology and Behavior*, 39,561-569, 1987a.

DE CASTRO JM. The time of day and the proportions of macronutrients eaten are related to total daily food intake. *Br J Nutr*; 98: 1077–1083, 2007.

DIEZ GARCIA RW. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana. *Rev Nutr*; 16(4): 483-92, 2003.

DOS SANTOS CORREA et al. Beverages characterize the nutritional profile of Brazilian adolescents' breakfast. *Nutrire* 41:3, 2016.

DUARTE MFS. Maturação física: uma revisão da literatura, com especial atenção a criança brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 9, p. 71-84, 1993.

DUBOIS L et al. Breakfast skipping is associated with differences in meal patterns, macronutrient intakes and overweight among pre-school children. *Public Health Nutrition* 12(1), 19–28, 2007.

DUBOIS L, GIRARD M, KENT MP, FARMER A, TATONE-TOKUDA F. Breakfast skipping is associated with differences in meal patterns, macronutrient intakes and overweight among pre-school children. *Public Health Nutrition*, Wallingford, v. 12, n.1, p. 1-10, 2008.

DWYER JT, EVANS M, STONE EJ, FELDMAN HA, LYTLE L, HOELSCHER D, et al. Adolescents' eating patterns influence their nutriente intakes. *J Am Diet Assoc.*; 101:798-802, 2001.

ELLACOTT KL, MORTON GJ, WOODS SC, TSO P, SCHWARTZ MW. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metab*; 12:10–7, 2010.

ETXEERRIA U et al. Shifts in microbiota species and fermentation products in a dietary model enriched in fat and sucrose. *Beneficial Microbes*, v. 5, n. 3, p. 1-15, 2015.

FARLEY C et al. Meal Pattern Analysis of Diet-Induced Obesity in Susceptible and Resistant Rats. *Obesity Research* V. 11 N. 7, p.845-851, 2003.

FELTRIN KL, LITTLE TJ, MEYER JH, et al. Effects of intraduodenal fatty acids on appetite, antropyloroduodenal motility, and plasma CCK and GLP-1 in humans vary with their chain length. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287 (3); 524-533, 2004.

FERRO CAVALCANTE TC, LIMA DA SILVA JM, MARCELINO DA SILVA AA, MUNIZ GS, LUZ NETO LM, LOPES DE SOUZA S, MANHÃES DE CASTRO R, FERRAZ KM, NASCIMENTO E. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical

Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. *Lipids*, v. 48, p. 1157-1168, 2013.

FERRO-CAVALCANTE TC, SILVA AAM, LIRA MCA, ALMEIDA LCA, MARQUES APJ, NASCIMENTO E. Early exposure of dams to a westernized diet has long-term consequences on food intake and physiometabolic homeostasis of the rat offspring. *Int J Food Sci Nutr*, v. 65, n.8, p.1–5, 2014.

FORBES JM, COWAN SP, ANDRIKOPOULOS S et al. Glucose homeostasis can be differentially modulated by varying individual components of a western diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 24; 1251–1257, 2013.

FONKEN LK, WORKMAN JL, WALTON JL, WEIL ZM, MORRIS JS, HAIM A et al. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107, 18664-18669, 2010.

FRANCISCHI RP, PEREIRA LO, LANCHI JR AH. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. *Rev Paul Educ Fís*;15:117-40, 2001.

GITA SHAFIEE et al. Association of breakfast intake with cardiometabolic risk factors. *J Pediatr (Rio J)*.; 89(6):575-582, 2013.

GRILL HJ. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. *Obesity*. 14 (Suppl 5):216S–21S, 2006.

HALBERG F. Chronobiology. *Annu Rev Physiol*; 31:675-725, 1969.

HALLSTRÖM L, LABAYEN I, RUIZ JR, PATTERSON E, VEREECKEN CA, BREIDENASSEL C, et al. Breakfast consumption and CVD risk factors in European adolescents: the HELENA (Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence) Study. *Public Health Nutr*.;16(7):1296- 305, 2013

HIROTA T. et al. Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, v.277, p. 44244-44251, 2002.

HOYLAND A, DYE L, LAWTON CL. A systematic review of the effect of breakfast on the cognitive performance of children and adolescents. *Nutr Res Rev*. Dec; 22(2):220-43, 2009.

JACQUES FO, TIYO R. Tratamento da obesidade com sibutramina. *Uningá Review*, v. 11(2), p.32-47, 2012.

KALSBECK A, FLEUR SL, FLIERS E. Circadian control of glucose metabolism. *Molecular metabolism*. Review, p. 1-12, 2014.

KATHARINA WM, KATRIN HILLE, JOCHEN KLENK, ULRIKE WEILAND. Influence of having breakfast on cognitive performance and mood in 13- to 20-Year-Old High School Students: Results of a Crossover Trial. *pediatrics*, 2008.

KERSTEN A, STRUBBE JH, SPITERI NJ. Meal Patterning of Rats with Changes in Day Length and Food Availability. *Physiology & Behavior*, Vol. 25, pp. 953-958. Pergamon Press and Brain Research Publ., 1980.

LA FLEUR SE, KALSBECK A, WORTEL J, FEKKES ML, BUIJS R. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes*, 50: 1237-1243, 2001.

LAMIA KA, STORCH KF, WEITZ CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15172-15127, 2008.

LEIDY HJ, MATTES RD, CAMPBELL WW. Effects of acute and chronic protein intake on metabolism, appetite, and hrelin during weight loss. *Obesity (Silver Spring, Md)*; 15: 1215–1225, 2007.

LEIDY HJ, RACKI EM, The addition of a protein-rich breakfast and its effects on acute appetite control and food intake in 'breakfast-skipping' adolescents, *International Journal of Obesity*; 34, 1125–1133, 2010.

LEJEUNE MP, WESTERTEP KR, ADAM TC, LUSCOMBE-MARSH ND, WESTERTEP-PLANTENGA MS. Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber. *Am J Clin Nutr*; 83: 89–94, 2006.

LE MAGNEN, J e M DEVOS. Metabolic basis of dual periodicity of feeding in rats. *Behavioral and Brain Sciences*. v.4, p.561– 607, 1984.

LEMMER B. Discoveries of rhythms in human biological functions: a historical review. *Chronobiol Int.*; 26(6):1019-68, 2009.

LUIS A. ANJOS. Body mass index as a tool in the nutritional assessment of adults: a review. *Ver. Saúde públ. São Paulo*, 26 (6): 431-6, 1992.

MALJAARS J, ROMEYN EA, HADDEMAN E, PETERS HPF, MASCLÉE AAM. Effect of fat saturation on satiety, hormone release, and food intake. *Am J Clin Nutr*; 89(4): 1019-24, 2009.

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, JEBAILLY L, WANG X, TAKAHASHI JS and BASS J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 466: 627-631, 2010.

MARCHIONI DML, GORGULHO BM, TEIXEIRA JA, VERLY JUNIOR E, FISBERG RM. Prevalence of breakfast omission and associated factors among adolescents in São Paulo: ISA-Capital. *Nutrire. Apr*;40(1):10-20, 2015.

MARKUS RP et al. Glândula Pineal e Melatonina. Em: N. Marques; L. Menna-Barreto. (Org) *Cronobiologia: princípios e aplicações*. São Paulo: Edusp, 2003.



MARQUES ACR, GABBIATTI GC, GRAVENA AAF, AMARAL V. Influence of hypercaloric diets on the parameters of obesity, dyslipidemia and hyperglycemia in rats. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2015.

MARQUES-LOPES I et al. Aspectos genéticos da obesidade. *Rev Nutr.*, Campinas, v.17, n. 3, jul./dez. 2004.

MARTINEZ JA. Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc Nutr Soc*; 59:337-45, 2000.

MELHORN SJ, KRAUSE EG, SCOTT KA et al. Acute exposure to a high-fat diet alters meal patterns and body composition. *Physiology & Behavior* 99; 33-39, 2010.

MENDONÇA CP, ANJOS LA. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. *Cad Saúde Pública*; 20 (3): 698-709, 2004.

MORTON GJ, CUMMINGS DE, BASKIN DG, BARSH GS, SCHWARTZ MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.*; 443: 289-95, 2006.

MUNIZ GS, SILVA AM, CAVALCANTE TC, SILVA-FRANÇA AK, FERRAZ KM, NASCIMENTO E. Early physical activity minimizes the adverse effects of a low-energy diet on growth and development parameters. *Nutritional Neuroscience*. v.16, n.3, p. 113-124, 2013.

MURRAY S, TULLOCH A, GOLD MS., AVENA NM. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 540–552, 2014.

NASCIMENTO EO, GUZMAN-QUEVEDO et al. "Long-lasting effect of perinatal exposure to L-tryptophan on circadian clock of primary cell lines established from male offspring born from mothers fed on dietary protein restriction." *PLoS One*, v. 8, n. 2, p. 1-14, 2013.

NASSAR ALS et al. Oxidative stress and fatty acid profile in Wistar rats subjected to acute food restriction and refeeding with high-fat diets. *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol.* 29 (3), p.178-185, 2014.

NG M, FLEMING T, ROBINSON M, THOMSON B, GRAETZ N, MARGONO C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet.*; 384(9945):766-781, 2014.

NICKLAS TA, REGER C, MYERS L, O'NEIL C. Breakfast consumption with and without vitamin-mineral supplement use favorably impacts daily nutrient intake of ninth-grade students. *J Adolesc Health.*; 27: 314-321, 2000.

NICKLAS TA, MORALES M, LINARES A, YANG S, BARANOWSKI T, DE MOOR C, et al. Children's meal patterns have changed over a 21-year period: the Bogalusa heart

study. J Am Diet Assoc.; 104(5):753-61, 2004.

NIEMEIER H, RAYNOR H, LLOYD-RICHARDSON E, ROGERS M, WING R. Fast food consumption and breakfast skipping: predictors of weight gain from adolescence to adulthood in a nationally representative sample. J Adolesc Health.; 39(6):842-9, 2006.

NISSEN LP, VIEIRA LH, BOZZA LF, VEIGA LT, BISCAIA BFL, PEREIRA JH, FURLAN LHP. Intervenções para tratamento da obesidade: revisão sistemática. Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade, v. 7(24), p. 184-90, 2012.

NOVELLI ELB, DINIZ YS, GALHARDI CM, EBAID GMX, RODRIGUES HG, MANI F. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. Laboratory Animals, v. 41, p. 111-9, 2007.

OLIVEIRA C, SCARABELOTL VL, CIOATO SG, CAUMO W, TORRES ILS. Interrelation between metabolic syndrome, chronic stress and circadian rhythms of adipogenic markers: a review. Rev HCPA; 33(3/4), 2013.

OOSTERMAN JE, BELSHAM DD. Glucose alters Per2 rhythmicity independent of AMPK, whereas AMPK inhibitor compound c causes profound repression of clock genes and AgRP in mHypoE-37 hypothalamic neurons. PloS one, v. 11, n. 1, p. e0146969, 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Organização PanAmericana de Saúde. Brasília, 60p, 2003.

O'REARDON JP, RINGEL BL, DINGES DF, ALLISON KC, ROGERS NL, MARTINO NS, et al. Circadian eating and sleeping patterns in the night eating syndrome. Obes Res.; 12(11):1789-96, 2004.

PEREIRA MA, ERICKSON E, MCKEE P, SCHRANKLER K, RAATZ SK, LITTLE LA, and PELLEGRINI AD. Breakfast frequency and quality may affect glycemia and appetite in adults and children. J. Nutr. 141: 163S-168S, 2011.

PIETROBELLI A, BONER AL, TATO L. Adipose tissue and metabolic effects: New insight into measurements. International Journal of Obesity, v. 29, suppl. 1, p. 97-100, 2005.

PIMENTEL GD et al. FOODS AND NUTRIENTS MODULATES THE RELEASE OF GASTROINTESTINAL HORMONES ANOREXIGENIC. Acta Med Port; 23: 891-900, 2010.

PHILIPPI ST. Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição. Barueri: Manole; 2008.

PICCHI MG, MATTOS AM, BARBOSA MR, DUARTE CP, GANDINI MA, PORTARI GV, JORDÃO AA. A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. Acta Cir. Bras. v.26, supl.2, 2011.

PROJETTO J. Mechanisms of insulin resistance caused by nutrient toxicity. *Hepatol Res.* v.33, n.2, p.87-91, 2005.

RAMPERSAUD GC, PEREIRA MA, GIRARD BL, ADAMS J, METZL JD. Breakfast habits, nutritional status, body weight, and academic performance in children and adolescents. *J Am Diet Assoc.*; 105(5):743-60, 2005.

REDONDO MR et al. Consumo de alimentos, energía y nutrientes em el desayuno de um colectivo de ancianos. Problemática más frecuente y diferencias em función de massa corporal. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.46, n.4, p.275-81, 1996.

REFINETTI R. Western diet affects the murine circadian system possibly through the gastrointestinal microbiota. *Biological Rhythm Research*, v. 48, n. 2, p. 287-296, 2017.

RODRIGUES PRM et al. Fatores associados a padrões alimentares em adolescentes: um estudo de base escolar em Cuiabá, Mato Grosso. *Ver Bras. Epidemiol* 15(3): 662-74, 2012.

RODRIGUES et al. Irregular breakfast habits are associated with children's increased adiposity and children's and parents lifestyle-related behavior: a population-based cross-sectional study. *Nutrire* 41:8, 2016.

RUDIC RD, Mc NAMARA P, CURTIS AM, BOSTON RC, PANDA S, et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2(11): e377, 2004.

SADACCA LA, LAMIA KA, de LEMOS AS, BLUM B and WEITZ CJ. An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia* 54: 120-124, 2011.

SALGADO-DELGADO R, ANGELES-CASTELLANOS M, SADERI N, BUJIS MR, ESCOBAR C. Food intake during normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology*. v. 151, n.3, p. 1019-29, 2010.

SANSINANEAS AS, CERONE SI, ZONCO I et al. Serum leptina levels in cattle with diferente nutritional conditions. *Nutrition Research*. 21:1045-1052, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2015-2016. OLIVEIRA, J. E. P.; VENCIO, S. (Org). São Paulo: AC Farmacêutica, 2016.

SCHEER, FRANK AJL, CHRISTOPHER J, MORRIS AND STEVEN A. Shea. "The internal circadian clock increases hunger and appetite in the evening independent of food intake and other behaviors." *Obesity* 21.3: 421-423, 2013.

SCHMITT FC. Autópsias, biópsias e citopatologia: O que são e como são utilizadas. In: Montenegro, M.R. & Franco, M. *Patologia: processos gerais*. 3ªed. São Paulo: Atheneu. p. 255-263, 1992.

SCHMIDT MI et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current

challenges. Lancet Brazil Series Working Group. Lancet, London, v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, 2011.

SCHULZ P, STEIMER T. Neurobiology of circadian systems. CNS Drugs; 23 Suppl.2, 2009.

SHAFAT A, MURRAY B, RUMSEY D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. Appetite 52(1):34–38, 2009.

SIEVENPIPER, JL, JENKINS DJA, JOSSE RG, VUKSAN V. Dilution of the 75-g oral glucose tolerance test increases postprandial glycemia: implications for diagnostic criteria. CMAJ. v.162, p.993–996, 2000.

SONG W, CHUN O, OBAYASHI S, CHO S, CHUNG C. Is consumption of breakfast associated with body mass index in US adults? J Am Diet Assoc; 105(9):1373-82, 2005.

SWEENEY NM, HORISHITA N. The breakfast-eating habits of inner city high school students. J Sch Nurs.; 21(2):100-5, 2005.

TODD AS, STREET SJ, ZIVIANE J, BYRME NM, HILLS AP. Overweight and obese adolescent girls: the importance of promoting sensible eating and activity behaviors from the start of the adolescent period. Int. J. Environ. Res. Public Health.; 12: 2306-29, 2015.

TRANCOSO SC, CAVALLI SB, PROENÇA RPC. Café da manhã: caracterização, consumo e importância para a saúde. Revista de Nutrição, Campinas, v. 23, n. 5, p. 859-869, 2010.

UTTER J, SCRAGG R, MHURCHU C, SCHAAF D. At-home breakfast consumption among New Zealand children: Associations with body mass index and related nutrition behaviors. J Am Diet Assoc.; 107(4):570-6, 2007.

WELLEN KE, HOTAMISLIGIL GS. Obesity induced inflammatory changes in adipose tissue. The Journal of Clinical Investigation, 112(12), 1785-1788, 2003.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity – preventing and managing the global epidemic. Geneva: Report of a WHO Consultation on Obesity, 1998.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report a WHO Consultation on Obesity. Geneva, 2000.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Status Report on Noncommunicable Diseases, 2010. NLM Classification. WA 500. Geneva; 2008.

WOODS SC, SEELEY RJ, RUSHING PA, D’ALESSIO D, TSO P. A Controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. J Nutr. v.133, n.4, p.1081-7, 2003.

WOODS SC. The control of food intake: behavioral versus molecular perspectives. Cell Meta. v.9 (6): 489-98, 2009.

YOUNG ME, BRAY MS. Potential role of peripheral circadian clock dysynchrony in the pathogenesis of cardiovascular dysfunction. *Sleep Medicine*. v.8, p. 656-667, 2007.

## **Anexo**

## ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética em Animais



**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Biociências**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br

Recife, 06 de junho de 2016.

Ofício nº 54/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

**Para: Prof.<sup>a</sup> Elizabeth do Nascimento**

Departamento de Nutrição

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.017868/2016-36

Certificamos que a proposta intitulada **“Influência da primeira refeição do dia subjetivo de ratas adolescentes sobre o estado nutricional na vida adulta”**, registrada com o nº **23076.017868/2016-36**, sob a responsabilidade de Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Elizabeth do Nascimento** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 31/05/2016.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 10/12/2016
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	55-60g/25 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do Depto de Nutrição da UFPE

Atenciosamente,



Prof. Dr. Pedro V. Carelli  
Presidente da CEUA / CCB - UFPE  
SIAPE 1801584